

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Einsatz moderner Sequenziertechniken für die Analyse des porcinen Darmmikrobioms und
zur detaillierten Pathogencharakterisierung**

von Claudia Karte

aus Burgstädt

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

Mentor: Prof. Dr. Martin G. Beer

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meiner Mutter.

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeiten sind in dieser Dissertationsschrift enthalten:

Publikation I: Gierse L C, Meene A, Schultz D, Schwaiger T, Karte C, Schröder C, Wang H, Wünsche C, Methling K, Kreikemeyer B, Fuchs S, Bernhardt J, Becher D, Lalk M, KolInfekt Study Group, Urich T, Riedel K. **A Multi-Omics Protocol for Swine Feces to Elucidate Longitudinal Dynamics in Microbiome Structure and Function.** *microorganisms* (November 2020). Online verfügbar unter: doi: 10.3390/microorganisms8121887

Publikation II: Karte C, Platje N, Bullermann J, Beer M, Höper D, Blome S. **Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019.** *BMC Veterinary Research* (September 2020). online verfügbar unter: doi: 10.1186/s12917-020-02548-4

Weitere wissenschaftliche Arbeiten, die nicht in der Dissertationsschrift enthalten sind:

Traxler S, Bischoff A-C, Saß R, Trefz P, Gierschner P, Brock B, Schwaiger T, Karte C, Blohm U, Schröder C, Miekisch W, Schubert J K. **VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection.** *Scientific Reports* (October 2018). online verfügbar unter: doi: 10.1038/s41598-018-33061-2

Schwaiger T, Sehl J, Karte C, Schäfer A, Hühr J, Mettenleiter T C, Schröder C, Köllner B, Ulrich R, Blohm U. **Experimental H1N1pdm09 infection in pigs mimics human seasonal influenza infections.** *PLOS ONE* (September 2019). online verfügbar unter: doi: 10.1371/journal.pone.0222943

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	3
II.	LITERATURÜBERSICHT	7
1.	VERFAHREN DER SEQUENZIERUNG	7
1.1.	Metagenomanalysen für die Charakterisierung neuer Pathogene und zur Charakterisierung der normalen Diversität.....	12
2.	DAS PORZINE DARMMIKROBIOM	15
2.1.	Die Bedeutung der Mikrobiomzusammensetzung für die Tiergesundheit in der Schweinehaltung.....	18
2.2.	Hintergrund der Kenntnis des porzinen Darmmikrobioms für die Verwendung des Schweins als humannahes Modelltier	21
3.	DAS AUFTRETEN DER PORZINEN EPIDEMISCHEN DIARRHOE	22
III.	ZIELSETZUNG	27
IV.	ERGEBNISSE	31
4.1.	PUBLIKATION I	33
4.2.	PUBLIKATION II	61
V.	DISKUSSION	73
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	85
VII.	SUMMARY	89
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	93
IX.	ANHANG	109
1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
2.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	111
3.	ERLAUBNIS ZUR VERVIELFÄLTIGUNG	111
X.	DANKSAGUNG	115

Kapitel I: EINLEITUNG

I. EINLEITUNG

Moderne Sequenziertechniken gestatten uns sowohl die Analyse komplexer Gemeinschaften von Organismen wie die des Darmmikrobioms als auch Detailanalysen von Pathogenen auf Metagenomebene. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beide Ansätze verfolgt und entsprechende Protokolle harmonisiert und in „Meta-Omics“ Ansätze integriert. Im Fokus stand dabei das Hausschwein als wichtiges Nutztier und Modell für humane Fragestellungen und Erkrankungen.

Das Mikrobiom des Verdauungstraktes hat weitreichende Auswirkungen auf die Wirtsgesundheit, die Fitness und das Wohlbefinden. So wurde gezeigt, dass Veränderungen des humanen Mikrobioms mit Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes und Adipositas, bestimmten Krebsformen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Auf der anderen Seite kann das Mikrobiom u.U. günstig beeinflusst werden, z.B. durch diätetische Maßnahmen oder gezielte Verabreichung von probiotischen Kulturen. Das Schwein ist dabei deutlich besser mit dem Menschen zu vergleichen als Nager und andere Labortiere. Vor diesem Hintergrund sind Detailkenntnisse des physiologischen Mikrobioms heranwachsender und adulter Schweine sowie die erkrankungsassoziierten Auslenkungen von großer Bedeutung. Ganzheitliche Ansätze zielen dabei auf das Metagenom, das Metaproteom und das Metabolom in ihrer Gesamtheit ab („Meta-Omics“). In der vorliegenden Arbeit wurde mit interdisziplinären Partnern eine integrierte Probenvorbereitung für tiefgefrorene Kotproben entwickelt. Das konsolidierte Protokoll steht nun für alle Ansätze zur Verfügung und wurde bereits im Rahmen eines weiterführenden Projektes eingesetzt. Die anschließende Datenintegration verknüpfte die Mikrobiom-Zusammensetzung mit der Funktion und Stoffwechselaktivität. Weiterführende Studien sind insbesondere hinsichtlich der Auslenkungen durch systemische und fieberhafte Erkrankungen geplant.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde ein metagenomischer Ansatz gewählt, um einen aktuellen Fall der porcinen epidemischen Diarrhoe (PED) aufzuklären. Die PED wird durch ein Alphacoronavirus verursacht. Die hoch ansteckende Erkrankung ist durch eine schwere Darmentzündung, wässrigen Durchfall, Erbrechen und Dehydrierung gekennzeichnet. Während alle Altersklassen von Schweinen erkranken können, sinkt die Sterblichkeit mit zunehmendem Alter. Nach langen Jahren der Abwesenheit wurden seit Mai 2014 diverse Fälle der PED in

Deutschland beschrieben, meistens mit milden Verläufen. Einige Betriebe verzeichneten jedoch auch schwere Verluste, die in vorangegangenen Studien weder den viralen Charakteristika noch möglichen Koinfektionen kausal zugeschrieben werden konnten. Der im Rahmen der Arbeit untersuchte Fall trat im Frühjahr 2019 in einen Ferkelerzeugerbetrieb im Nordwesten Deutschlands auf und betraf Sauen, ihre Saugferkel und Absetzer. Mit der Zielsetzung das Virus im Detail zu charakterisieren und mögliche Koinfektionen aufzudecken, wurden Kot- und Dünndarmproben von betroffenen Schweinen metagenomischen Analysen unter Verwendung der Hochdurchsatzsequenzierung (*next-generation sequencing*) unterzogen. Phylogenetische Analysen zeigten hohe Identitäten zwischen den PEDV-Sequenzen, die aus Proben verschiedener Tiere gewonnen wurden, und eine besonders enge Verwandtschaft mit aktuellen Stämmen aus Ungarn und Frankreich. Im Vergleich zu den im Jahr 2014 analysierten PEDV-Stämmen konnte eine genetische Drift bestätigt werden. Erwartungsgemäß wurden Veränderungen hauptsächlich im Spike-Protein-kodierenden S-Genabschnitt beobachtet. Darüber hinaus zeigten metagenomische Analysen mehrere *Picobirnavirus-Reads* in allen untersuchten Proben. Letztere bedürfen weiterer Analysen zur Einordnung ihres Einflusses auf den Krankheitsverlauf.

Die durchgeführten Studien bilden die Basis für weitere Detailuntersuchungen zum porzinen Darmmikrobiom und für Metagenomansätze in der Pathogenerkennung und -charakterisierung beim Schwein.

Kapitel II: LITERATURÜBERSICHT

II. Literaturübersicht

1. VERFAHREN DER SEQUENZIERUNG

Die Einführung der modernen Sequenziermethoden der 2. Generation, auch als *next-generation sequencing* (NGS) bezeichnet, revolutionierte die Anwendung der DNA-Sequenzierung (1). Die zuvor weit überwiegend eingesetzte Methode für die DNA-Sequenzierung war die von Frederick Sanger und Kollegen schon 1977 vorgestellte Didesoxy-Kettenabbruchmethode (2). Diese Methode wurde in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts so optimiert (3, 4), dass die Sequenzierung als sogenannte Shotgun-Sequenzierung ohne bekannten Startpunkt für die Sequenzierungsreaktion und zudem halbautomatisch erfolgen konnte (heute oft auch als Sequenzierung der 1. Generation bezeichnet). Dennoch blieben auch fortan der Arbeitsaufwand und die Kosten hierfür verhältnismäßig hoch. Mit den ab 2005 vorgestellten Sequenziermethoden der 2. Generation (Genome Sequencer (5), Illumina (6) und Ion Torrent Technik (7)) wurden durch Parallelisierung Arbeitsaufwand und Kosten massiv reduziert und gleichzeitig der Durchsatz um Größenordnungen erhöht (8-10). Alle Methoden der 2. Generation waren zunächst als Shotgun-Sequenzierung konzipiert und beginnen mit der Fragmentierung der Ziel-DNA auf eine definierte Länge durch mechanische (z.B. Ultraschall) oder enzymatische Verfahren. Sequenzierungsmethoden der dritten Generation umfassen die Sequenzierung besonders langer Nukleinsäurefragmente und werden zum Beispiel durch das System von Pacific BioSciences (11) und Oxford Nanopore (12) repräsentiert. Diese Techniken benötigen keine klonale Amplifikation der DNA-Fragmente vor der Sequenzierung und die Reaktion findet direkt am einzelnen Molekül statt (9, 10). Bei dem Einsatz dieser Technologie können einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA und RNA analysiert werden (12).

Abbildung 1 zeigt einen Überblick über die Hauptschritte für die Probenvorbereitung und Datenauswertung bei Anwendung der Sequenziertechniken der gegenwärtig drei Generationen von Sequenziertechnologien (13). Die wesentlichen Unterschiede liegen bei der Probenvorbereitung und den zum Auslesen der Sequenz eingesetzten Verfahren (14). Bei der DNA-Sequenzierung der 1. Generation werden die DNA-Fragmente entweder direkt als PCR-Produkte oder nach Klonierung in einen Plasmidvektor sequenziert. Der Plasmidvektor dient auch der klonalen Amplifikation der DNA in bakteriellen Zellen (3). Die Amplifikation der DNA ist notwendig,

um bei der Sequenzierung eine vom jeweiligen System detektierbare Signalstärke zu erreichen. Daran anschließend wurden, für die Sequenzierung der 1. Generation, die klonal in einzelnen Bakterienkolonien amplifizierte Plasmide aus den individuellen Bakterienkolonien isoliert und jeweils die Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Danach erfolgte die serielle automatische Sequenzdetektion der Fluorophor-markierten DNA im Kapillarsequencer (begrenzt parallelisierbar, in einem Gerät bis zu 16 Kapillaren; darüber hinaus nur durch Einsatz mehrerer Geräte). Die Sequenzierung der 1. Generation ist somit sowohl durch die Sequenzierkapazität als auch durch den Aufwand und die Kosten limitiert, insbesondere wenn es um die Bestimmung von großen Genomen geht. Diese Limitationen waren Treiber für die Entwicklung der neuen Sequenzertechnologien.

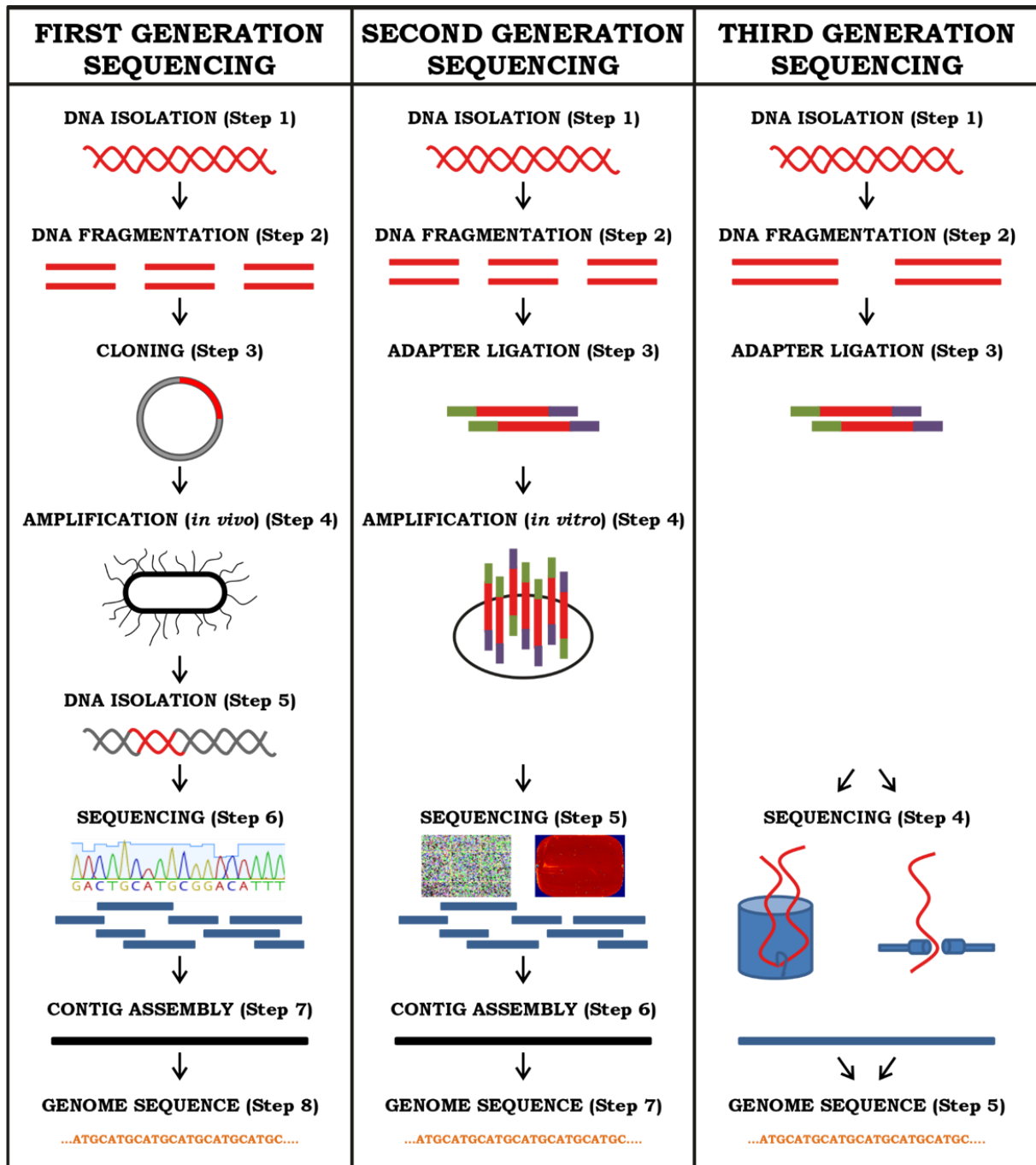


Abbildung 1. Übersicht über die Hauptschritte der Sequenziertechniken (15). Überblick über die Hauptschritte der Revolutionen der Sequenziertechnologien der gegenwärtig drei Generationen. Abbildung modifiziert: Srivastav et al. 2019 (15), zu den Genehmigungsrechten siehe Kapitel IX: Anhang, 3. Erlaubnis zur Vervielfältigung.

Die Shotgun-Sequenzierung mit Technologien der 2. Generation stellt die konsequente Weiterentwicklung der 1. Generation dar. Die wesentlichen Unterschiede zwischen den Sequenziertechnologien der 1. und der 2. Generation sind der Wegfall der Notwendigkeit, individuelle

DNA-Fragmente zu bearbeiten und die Parallelisierung des Auslesens. Durch geeignete Technologien zur klonalen Amplifikation (Emulsions PCR bei Genome Sequencer und Ion Torrent; Bridge Amplification bei Illumina) entfiel die Notwendigkeit der Klonierung der DNA in Plasmidvektoren und Amplifikation *in vivo*, weil es durch die genannten Amplifikationsverfahren möglich wurde, die klonale Amplifikation *in vitro* durchzuführen. Dadurch war es nicht mehr erforderlich, individuelle Moleküle zu bearbeiten. Dies ermöglichte die Parallelisierung der Amplifikation, um so millionenfach erhöhte Sequenzausbeuten zu erreichen (16). Die zweite entscheidende Verbesserung war die Möglichkeit, die Sequenzierreaktion hochgradig zu parallelisieren (zunächst mehrere Millionen Genomstücke (sog. *Reads*) pro Gerätelauf, inzwischen bis zu mehreren Milliarden in einem Gerätelauf) und die Sequenz simultan auszulesen (im Unterschied zur 1. Generation, bei der erst die Sequenzierreaktion durchgeführt werden muss und danach das Ergebnis ausgelesen wird). Auch die Kosten pro analysierter Sequenzmenge wurden mit den neuen Technologien drastisch reduziert. Somit entfielen mit der Einführung der Sequenzierung der 2. Generation die zuvor bestehenden Limitationen und es begann eine neue Ära der Genomsequenzierung (14).

Im Detail besteht der Arbeitsablauf für die Sequenzierung mit Verfahren der 2. Generation aus den wesentlichen Schritten (i) Herstellung einer DNA-Bibliothek, (ii) klonale Amplifikation der Moleküle der DNA-Bibliothek, (iii) Sequenzierung der DNA-Klone und (iv) Auswertung der generierten Rohdaten. Abbildung 2 zeigt exemplarisch den Arbeitsablauf für die Illumina-Sequenzierertechnologie (6, 17). Für die Herstellung einer Shotgun-DNA-Bibliothek wird die Ziel-DNA zufällig fragmentiert und nach dem sogenannten *fragment-end-polishing*, bei dem Einzelstrangüberhänge an den Enden der DNA-Moleküle beseitigt werden, werden die Adapter an die DNA-Fragmente ligiert (siehe Abbildung 2 a). Die Adapter dienen sowohl als Primerbindestellen für die bereits zuvor genannte klonale Amplifikation als auch als Bindestellen für die Primer, von denen aus die Sequenzierreaktion gestartet wird (siehe Abbildung 2 b). Die klonale Amplifikation ist der Sequenzierung vorgeschaltet und wird im Sequenziergerät direkt auf den Oberflächen der Flowcell, in der die Sequenzierung stattfindet, durchgeführt. Nach der als Bridge-Amplification bezeichneten Generierung von Millionen Clustern klonaler DNA-Fragmente startet die Sequenzierung. Dazu wird zunächst die an die Flowcell gebundene DNA denaturiert und anschließend der Sequenzierprimer an die Fragmente hybridisiert. An die Hybride aus Primer und einzelsträngiger Template-DNA bindet eine DNA-Polymerase (siehe Abbildung 2 c). Während des Sequenziervorganges, bei dem zyklisch Nukleotide mit allen 4 Basen

gleichzeitig in die Flowcell gepumpt werden, baut die DNA-Polymerase das jeweils passende Nukleotid ein. Die verwendeten Nukleotide sind an den Basen modifiziert, so dass

1. aufgrund einer 3'-Blocking-Gruppe jeweils nur ein Nukleotid pro Zyklus eingebaut werden kann und
2. die in den Molekülen der individuellen Cluster eingebauten Basen aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der Basen identifiziert werden können.

Nach dem Auslesen der Fluoreszenzsignale werden die „Blocking-Gruppen“ von den Nukleotiden entfernt und der nächste Zyklus startet. Auf diese Art können von jedem Cluster Sequenzen von bis 300 Basen ausgelesen werden. Dabei repräsentiert jedes Cluster ein einzelnes Stück DNA aus der Originalprobe (6, 17).

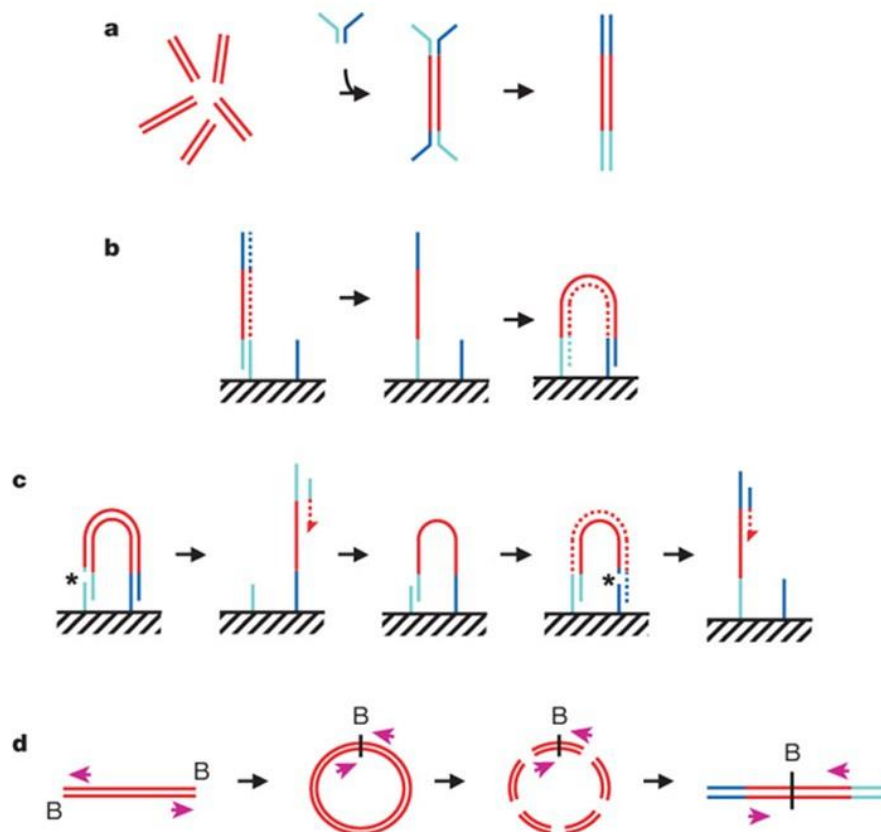


Abbildung 2. Illumina-Sequenzierung mit Brückensynthese (6). Abbildung: Bentley et al. 2008 (6) unter Creative Commons CC-BY-NC-SA 3.0.

Für die Sequenzierung viraler Genome eröffnete das NGS neue Möglichkeiten, da das ungünstige Verhältnis zwischen Virus und Wirt aufgrund der jetzt möglichen sehr großen Datensätze

relativiert wurde. So lassen sich beispielsweise bei einem Anteil von 0,1 % Virus in einer Nukleinsäuremischung mit einem Datensatz von nur wenigen Millionen *Reads* für das Virusgenom verhältnismäßig einfach genug *Reads* generieren, um eine zuverlässige und vollständige Genomsequenz des Virus zu generieren.

Auch die Detektion unerwarteter oder bislang unbekannter Viren mithilfe der sogenannten Metagenomanalyse wurde so möglich (9, 18, 19). Nach Gilbert und Dupont (2011) ist die grundlegende Definition der Metagenomanalyse die Analyse der genomischen DNA einer ganzen Gemeinschaft (20). Eine differenziertere, hier noch besser zutreffende Definition stammt von Chen und Pachter (21): "Metagenomics is the application of modern genomics techniques to the study of communities of microbial organisms directly in their natural environments, bypassing the need for isolation and lab cultivation of individual species." Da für die initiale Detektion eines Virus der Nachweis eines einzelnen oder einiger weniger *Reads* ausreichend ist, ist selbst bei Virusanteilen im ppm-Bereich die Detektion noch möglich. Voraussetzung dafür ist allerdings immer, dass es in der für den Sequenzabgleich verwendeten Sequenzdatenbank eine hinreichend ähnliche Sequenz gibt, die die Erkennung viraler Sequenzen ermöglicht (22).

1.1. Metagenomanalysen für die Charakterisierung neuer Pathogene und zur Charakterisierung der normalen Diversität

Die Fortschritte bei den NGS-Technologien und die schnelle Entwicklung der Bioinformatik und ihrer Werkzeuge bieten Möglichkeiten der Überwachung und Erkennung sich neu ausbreitender Erkrankungen bei Mensch und Tier in bislang nie erreichter Qualität (23). Eine der wichtigsten NGS-Anwendungen ist die primerunabhängige, agnostische (d. h. ohne Vorkenntnisse) virale Metagenomik (metagenomisches NGS, mNGS, Metagenomdiagnostik), um alle in den Proben vorhandenen Viren zu charakterisieren und auch die Entdeckung neuartiger oder ungewöhnlicher infektiöser Ätiologien zu ermöglichen (24).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass kürzlich das sogenannte „Global Virome Project“ gestartet ist. Das Konzept beinhaltet die Identifizierung unbekannter und potentiell zoonotischer Viren von Säugetieren und Vögeln (25). Allerdings erfordert die Verwendung von mNGS als potenzielles Überwachungsinstrument ein tieferes Verständnis dessen, was eine "normale" Diversität, d.h. ein normales Mikrobiom oder Virom beim Menschen (26), wie auch

bei Wildtieren (27) und Nutztieren (28, 29) ausmacht. Mihalov-Kovacs et al. (18) untersuchten in diese Richtung das Kotvirom unterschiedlicher Haus- und Nutztiere. In porzinen Kotproben wurden dabei zahlreiche Viren wie *Kobuvirus*, *Sapovirus*, *Sapelovirus*, *Coronavirus*, *Teschovirus*, *Porzines Astrovirus*, *Bocavirus*, *Rotavirus C* und *A*, *Picobirnavirus*, *Parvovirus*, *Circovirus* und *Picornavirus* gefunden (18). Eine ähnlich aufgebaute wissenschaftliche Studie beschreibt die Virusvielfalt in verschiedenen Arten von Proben wie Kotproben oder Proben aus dem Verdauungstrakt von Nutztieren wie Rindern, kleinen Wiederkäuern (Ziegen und Schafe), Geflügel und Schweinen. Auch in dieser Studie bestätigte sich eine reichhaltige Virusvielfalt wie Wirbeltierviren, Bakteriophagen (*Myoviridae*, *Podoviridae* und *Siphoviridae*) und Pflanzenviren. *Astroviridae*, *Parvoviridae* und *Picornaviridae* gehörten zu den am häufigsten gefundenen Virusfamilien (30).

Einige neue Viren, die für die Tiermedizin bedeutsam sind, wurden mittels Metagenomanalysen identifiziert (10). Ein Beispiel für die Charakterisierung eines neuen Pathogens ist die Detektion und Charakterisierung des Schmallenberg-Virus. Dieser Erreger wurde im Jahr 2011 erstmals beschrieben. Hintergrund waren Erkrankungen bei Kühen aus der Umgebung von Schmallenberg (Nordrhein-Westfalen, Deutschland), die Fieber, Durchfall und sinkende Milchleistungen unbekannter Genese zeigten. Neugeborene infizierter Tiere kamen missgebildet zur Welt. Die durchgeführten Metagenomanalysen wiesen auf das Vorkommen eines neuen Orthobunyavirus hin, das nachfolgend „Schmallenberg-Virus“ benannt wurde (31). Dieser Fall untermauert eindrucksvoll, dass die Metagenomanalyse ein nützliches Hilfsmittel für die Tiergesundheit ist, da sie für eine Entdeckung möglicher pathogener Erreger herangezogen werden kann (32).

Ein weiteres Beispiel ist die Entdeckung eines bis dahin unbekannten, zoonotischen Bornavirus in Bunt- und Schönhörnchen, das mittels mNGS entdeckt wurde. Das Bunthörnchen-Bornavirus 1 (Variegated Squirrel Bornavirus 1, VSBV-1) wurde bei gesunden Bunt- und Schönhörnchen und bei drei Züchtern von Bunthörnchen nachgewiesen, die zwischen 2011 und 2013 an Enzephalitis erkrankten und verstarben. Umfangreiche molekularbiologische und immunhistologische Untersuchungen konnten belegen, dass es sich bei VSBV-1 um einen neuen zoonotischen Erreger handelt und sich die drei verstorbenen Züchter bei ihren infizierten Bunthörnchen angesteckt hatten (33).

Durch eine großangelegte Studie konnte eine weitere Krankheit mit bislang ungeklärter Ätiologie bei Nerzen aufgeklärt werden. Die Tiere zeigten neurologische Störungen wie Schütteln, torkelnder Gang und Ataxien. Durch Untersuchungen von Hirnproben mittels Metagenomik gelang der Nachweis eines neuartigen Astrovirus. Dieser Befund ist eine der ersten Beschreibungen eines Astroviruses im zentralen Nervensystem von Tieren. Die Krankheit bei Nerzen erhielt den Namen „Shaking Mink Syndrome“ (34).

Neuestes Beispiel ist die Entdeckung der ersten Rubellavirus-ähnlichen Viren in Tieren. Von Juli 2018 bis Oktober 2019 zeigten ein Esel, ein Wasserschwein und ein Rothalswallaby schwere, akute neurologische Symptome wie Ataxien, Krämpfe, Lethargie und Unempfindlichkeit. Alle Tiere lebten in demselben Zoo in der Nähe der Ostseeküste im Norden Deutschlands. Von September 2019 bis Februar 2020 wurden Nagetiere im Umkreis von 10 km um dieses Zoogelände für weitere Untersuchungen gesammelt. Mit Hilfe von metagenomischen und phylogenetischen Analysen konnten Bennett et al. (35) in allen untersuchten Proben das neue Rustrela-Virus (RusV) bestätigen. Das Rustrela-Virus gehört in die Außengruppe der Klade der Ruhugu-Viren (RuhV) und Rubella-Viren (RuV). Ruhugu-, Rustrela- und Rötelviren besitzen einen identischen genomischen Aufbau. Das Rustrela-Virus wurde nach seinem Rötelvirus-ähnlichem Genom und dem Ort am sogenannten Strelasund an der Ostsee in Deutschland benannt (35).

2. DAS PORZINE DARMMIKROBIOM

Das intestinale Mikrobiom stellt die Gesamtheit aller Mikroorganismen dar, die den Darm natürlicherweise besiedeln und dort eine komplexe Biozönose bilden (36, 37). Dieses komplexe und dynamische Ökosystem besteht aus Bakterien, Archaeen, Eukaryoten und Viren (siehe Abbildung 3) (38). Mit eingeschlossen werden resident, transient, symbiotisch und kommensalisch lebende Mikroorganismen, sowie fakultativ pathogene Mikroben (37, 39).



Abbildung 3. *Das intestinale Mikrobiom beim Hausschwein (36-38). Überblick über die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms, das aus Bakterien, Archaeen, Eukaryoten und Viren besteht.*

Die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms beim Schwein ist gekennzeichnet durch eine Vielfalt von Phyla. Bei den Bakterien bilden Firmicutes und Bacteroidetes mit über 90 % die beiden Hauptphyla. Die restlichen Anteile verteilen sich auf Proteobacteria, Actinobacteria und Spirochaetes (40-42). Je nach Darmabschnitt unterscheidet sich die Verteilung der mikrobiellen Gemeinschaften (40). Im Jejunum und Ileum zeigten Analysen der Mikrobiome eine unterschiedliche Zusammensetzung. Im Jejunum dominieren Bakterien vorwiegend aus dem Phylum Firmicutes, gefolgt von den Phyla Proteobacteria, Cyanobacteria und Actinobacteria. Im Ileum dominieren die beiden Phyla Firmicutes und Proteobacteria. Die Zusammensetzung der Mikrobiome des Kolons und Zäkums erwiesen sich als sehr ähnlich. Mehr als 90 % der nachgewiesenen Bakterien gehörten den beiden Phyla Firmicutes oder Bacteroidetes an (40).

Archaeen wurden zu weniger als einem Prozent der gesamten rRNA-Gen-Sequenzen von Schweinen nachgewiesen. Dominierende Archaeen sind Methanomicrobia und Thermococci. Eukaryotische Mikroben gehören hauptsächlich zu wirtsspezifischen Phyla, zu Pilzen und Protozoen insbesondere *Balantidium coli* (42).

Viren stellen eine kleine Minderheit im Kotmaterial dar (42, 43), können jedoch in vielfältiger Weise im Gastrointestinaltrakt (GIT) vorkommen. Einige Viren können als Krankheitserreger agieren. Bakteriophagen, Viren die Bakterien befallen, regulieren das Wachstum von Bakterien (44). Die Analyse des intestinalen Viroms, bestehend aus eukaryotischen (wirtsspezifische Viren), prokaryotischen (Bakteriophagen) und transienten Viren (z.B. Pflanzenviren) sowie Viren, die Amöben infizieren, zeigt eine Zusammensetzung, bei der RNA-Viren überwiegen (43-49). Der Großteil der nachgewiesenen Virussequenzen sind Schweineviren, die restlichen Sequenzen verteilen sich auf Bakteriophagen, Pflanzen- und Insektenviren (50). Virussequenzen, zugehörig zu den wirtsspezifischen Viren, gehören den Familien *Picornaviridae* (z.B. *Enterovirus*, *Sapelovirus* und *Kobuvirus*), *Astroviridae* (z.B. *Mamastrovirus*), *Reoviridae*, *Caliciviridae* (z.B. *Sapovirus*), *Parvoviridae* (z.B. *Bocavirus*), *Circoviridae* und *Picobirnaviridae* an (38, 46, 50). Bei den Bakteriophagen wurden häufig Familien wie *Siphoviridae*, *Microviridae* und *Myoviridae* nachgewiesen (45, 46).

Jedes Tier besitzt sein individuelles intestinales Mikrobiom, abhängig von diversen endogenen und exogenen Faktoren, die an der Reifung von der Geburt bis zum Erwachsenenalter (siehe Abbildung 4) und folglich der Zusammensetzung des Darmmikrobioms gleichzeitig beteiligt sind (36, 41, 51, 52).



Abbildung 4. Die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beim Hausschwein (36, 51, 53). In Abhängigkeit von der Geburt beginnt die Entfaltung des anfänglichen Darmmikrobioms. Postnatal ist die Besiedlungsdichte des Darms gering und die Vielfalt des Mikrobioms steigt zunehmend. Während der Saugphase schreitet die Besiedlung voran. Nach dem Absetzen über die

Phase der Jungtieraufzucht entwickelt sich das intestinale Mikrobiom bis hin zum adulten Tier bedingt durch unterschiedliche exogene und endogene Einflussfaktoren weiter.

Die Besiedlung des Verdauungskanals beginnt schon während der Geburt und ist von der Art der Geburt (natürliche Geburt oder Schnittentbindung), dem Muttertier und von der Geburts-umgebung abhängig. Die Komposition des fetalen Darmmikrobioms steht in Verbindung mit der mütterlichen Dermal-, Vaginal- und Fäkalflora bei einer Vaginalgeburt (51, 54, 55). Primär siedeln sich natürlicherweise Enterobakterien (*E. coli*), *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* und *Streptococcus spp.* an (53-55). Neugeborene, die durch eine *Sectio caesarea* auf die Welt kommen, haben zunächst ein anderes Besiedlungsverhältnis (54). Die Mikrobiota der Umgebung treten initial prominent in Erscheinung (51).

Die Saugferkelphase geht vom Partus bis zum Absetzen, in der Regel bis zu einem Alter von rund vier Wochen. Dann werden die Ferkel vom Muttertier abgesetzt. Bis zu einem Alter von zehn Wochen gelten sie als Absatzferkel. Ist ein Absetzen früher erforderlich, z.B. zum Schutz des Muttertieres oder der Saugferkel, darf ein Absetzen im Alter von über drei Wochen erfolgen (56). Bei neugeborenen Ferkeln sollte innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden nach der Geburt die Kolostrumaufnahme erfolgen, da der Darm die Fähigkeit verliert Immunglobuline aufzunehmen und die mütterlichen Antikörper nicht plazentagängig sind (57). Neben der Herstellung der passiven Immunität, Energieversorgung und Nährstoffbereitstellung sind Bakterien im Kolostrum enthalten (53, 58). In der anfänglichen Saugperiode dient den Saugferkeln Milch als Hauptnahrungsquelle und die Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes (MDT) schreitet voran (53, 59). Bei Muttermilch-ernährten Ferkeln siedeln sich hauptsächlich *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Enterococcus* an. Eine andere intestinale Mikrobiota als mit Muttermilch aufgezogene Saugferkel weisen hingegen Ferkel auf, die mit Ersatzmilch aufgezogen worden sind (53). Die Gabe eines Entwöhnungsfutters formt zusätzlich die Reifung der Darmmikrobiota. Es kommt zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Vielfalt, sowie zu einem Zuwachs der Mikrobengemeinschaft (60).

Absetzen ist eine kritische Lebensphase beim Schwein und führt durch Veränderungen in der Umwelt (Umgruppierung, Futtermittel- und Umgebungswechsel), Allgemeinerkrankungen (Durchfall mit *E. coli* und anderen Darm-assoziierten Infektionserregern) und deren Behand-

lungen zu Stress und trägt maßgeblich zu Verschiebungen in der Komposition der Darmmikrobiota bei (36, 61-64). Zu den bisherigen Mikroben kommen neue konkurrierende Stämme hinzu und die Diversität entfaltet sich (36).

Der pH-Wert im Magen liegt bei einem ausgewachsenen Schwein in einem Bereich von etwa 2. Dieser hohe Säuregehalt hemmt eine zu schnelle Bakterienvermehrung (65). Bei Ferkeln hingegen liegt der anfängliche Magen pH-Wert ähnlich dem des Nahrungsbreis und sinkt mit zunehmendem Alter erst allmählich ab. Dadurch können sich Bakterien frei vermehren. Hinzu kommt, dass Sauenmilch und Milchersatznahrung eine hohe säurepuffernde Wirkung haben und die Magensäure neutralisieren. Es verbleibt kaum freie Magensäure und somit steigt die Häufigkeit von Magen-Darm-Erkrankungen (65). Adulte Schweine weisen im Vergleich zum Absetzer bzw. Jungtier ein stabileres intestinales Darmmilieu auf und sind gegenüber dynamischen Einflüssen aus der Umgebung unempfindlicher. Die Vielfalt und Fülle der mikrobiellen Darmgemeinschaft nimmt mit fortschreitendem Alter ab (66).

2.1. Die Bedeutung der Mikrobiomzusammensetzung für die Tiergesundheit in der Schweinehaltung

Der Magen-Darm-Kanal übernimmt mit sekretorischen Funktionen, den mikrobiellen Stoffwechselleistungen vornehmlich im Dickdarm, der Verdauung und Resorption von Nährstoffen zum Erwerb von Energie, sowie der Entgiftung und Aufrechterhaltung der Immunhomöostase wichtige Funktionen im Körper (67, 68). Die Vielfalt der Mikroorganismen im Verdauungskanal unterstützt dabei viele Aufgaben und hat somit einen Einfluss auf die Gesundheit (40, 62). Die Mikroorganismen sind beteiligt an der Vitaminsynthese (z.B. Pantothersäure, Cobalamin, Vitamin K, Folsäure, Nikotinsäureamid), Stimulation des Immunsystems, am Schutz vor Krankheitserregern und dem Abbau schwer verdaulicher Ballaststoffe (40, 62, 69). Aus dem mikrobiellen Abbau schwer verdaulicher Nahrungsbestandteile werden kurzkettige Fettsäuren (SCFA, Short Chain Fatty Acid) wie Acetat, Propionat und Butyrat im Darm gebildet. Diese stehen den Darmschleimhautzellen des Wirtsorganismus als Energiequelle bereit, das Darmmilieu wird angesäuert und Elektrolyte und Spurenelemente werden zusätzlich resorbiert (36, 40, 69).

Die „Eubiose“ stellt eine stabile und ausgewogene Zusammensetzung der Mikroflora dar. Kommt es zu einem mikrobiellen Ungleichgewicht des Darmmikrobioms spricht man von einer

„intestinalen Dysbiose“ (62, 64, 69-72). Es kommt zu einem Diversitätsverlust mit einer Abnahme der obligat anaeroben Bakterien (z.B. Clostridien) und zu einer relativen Zunahme der fakultativ anaeroben Bakterien (z.B. *Enterobacteriaceae*) im GIT. Folgen sind eine Entzündung der Darmmukosa, eine erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut mit erhöhtem Durchdringen von Toxinen und Pathogenen und einem Ausbreiten von Darm-assoziierten pathogenen Erregern (62). Die Tiere leiden unter Diarrhoe und einer erhöhten Infektanfälligkeit (62, 73).

Zum intestinalen Mikrobiom von Schweinen gehören physiologisch *E. coli* Bakterien, die der Familie der *Enterobacteriaceae* zugehörig sind. Verschiedene Stämme besitzen Virulenzfaktoren, die pathogenes Potential entwickeln können und bei Schweinen hauptsächlich in der Aufzuchtphase Erkrankungen verursachen können (Enteric colibacillosis). Durchfallbedingte Schwierigkeiten treten beim Absatzferkel oftmals innerhalb von zehn Tagen nach dem Absetzen auf und sind durch ETEC-Stämme (enterotoxische *E. coli*) bedingt. Die Tiere zeigen wässrigen Kot von graugrüner bis bräunlicher Farbe mit Blutbeimengungen. Weitere Symptome sind Apathie, Zyanosen und Dehydratation (61, 67, 74-76).

Ein bis zwei Wochen nach dem Absetzen können die Tiere durch eine zu große Aufnahme an Futter mit der Folge einer massiven Vermehrung der enteropathogenen Stämme von *E. coli* im Dünndarm an Colienterotoxämie (Ödemkrankheit) erkranken. Hervorgerufen wird sie durch STEC (Shiga-Toxin-bildende *E. coli*; Stx 2 e: Shiga-Toxine (Stx) Typ 2 Variante e (= edema) bildende *E. coli*). Die typische Symptomatik stellt sich mit Ödemen im Kopfbereich (Augenlider, Nasenrücken und Maul), neurologischen Ausfallerscheinungen (Apathie, Schreckhaftigkeit, Ataxien, Festliegen in Seitenlage und Ruderbewegungen), Dyspnoe und Schockzuständen dar. Die Morbidität liegt bei bis zu 30 %, die Letalität bei nahezu 100 %. Einzelne überlebende Tiere kümmern, wachsen auseinander und zeigen chronische zentralnervöse Störungen. Die damit einhergehende Problematik und verlängerte Mastdauer, sowie weiteren Kosten für kurative Behandlungen führen zu erhöhten wirtschaftlichen Verlusten (61, 74-76).

Neben einem optimalen Fütterungskonzept mit hochwertigen Futterrohstoffen von hoher hygienischer Qualität können Zusatzstoffe in Futtermitteln wie „ernährungsphysiologische Zusatzstoffe“ (z.B. Vitamine, Provitamine oder Spurenelemente) oder „zootechnische Zusatzstoffe“ (z.B. Verdaulichkeitsförderer oder Darmflorastabilisatoren) oder die Zugabe von Präbiotika helfen, die Intestinalflora zu stabilisieren und unerwünschte Mikroben zu beseitigen (64, 77-80). Bestimmte in Futtermitteln enthaltene Inhaltsstoffe, insbesondere Ballaststoffe

wie Pektin, können eine günstige Zusammenstellung an protektiven Mikroorganismen fördern (69). Eine zu fetthaltige Diät unterstützt ein Ungleichgewicht der Zusammensetzung des Darmmikrobioms und beeinträchtigt die Darmbarriere. Weiterhin verschiebt sich das Verhältnis zwischen Firmicutes und Bacteroidetes (81). Zu den Darmflorastabilisatoren zählen Probiotika wie *Lactobacillus casei* oder *Enterococcus faecium* (69, 78). Diese lebenden Mikroorganismenkulturen müssen so unempfindlich sein, dass sie die Digestion unbeschadet überstehen (69). Sie wirken sich günstig auf die Balance der Intestinalflora aus, die Ansiedlung pathogener Erreger wird erschwert und sie haben positive Effekte auf die Tiergesundheit (78). Präbiotika wie Inulin oder Lactulose dienen den intestinalen Bakterien als fermentierbares Substrat und können nicht durch körpereigene Enzyme verarbeitet werden. Aus ihnen werden vermehrt kurzkettige Fettsäuren gebildet. Diese dienen als Energiezufuhr für das Darmepithel und durch die Bildung von organischen Säuren wie Milchsäure sorgen sie für eine Ansäuerung des Darmmilieus, und fördern somit die Entfaltung säureliebender Keime und hemmen die Ausbreitung fäulnis-verursachender Keime (69).

Ein Fütterungsvergleich (ein Futter fein vermahlen, ein Futter grob pelletiert und ein Futter grob pelletiert mit einem Zusatz von 1,8 % Ameisensäure), zeigt, dass das grob pelletierte Futtermittel eine Zunahme an Anaerobiern und Milchsäure produzierenden Bakterien fördert und sich eine verringerte Anzahl an *Enterobacteriaceae* (d.h. Salmonellen und coliforme Bakterien) nachweisen lässt. Ein geringer pH-Wert, hohe Konzentrationen an organischen Säuren und eine bedeutende Menge an Milchsäurebakterien erwies sich als wirksam für die Bekämpfung von Salmonellen im MDT von Schweinen (82). Weitere positive Auswirkungen einer größeren Futterstruktur auf die Tiergesundheit in der Schweinehaltung sind eine *E. coli* Prophylaxe bei Ferkeln und geringere Diathese an Magenulcera vorrangig bei Mastschweinen. Sauen zeigen weniger Obstipationen. Tragende Sauen haben eine höhere mechanische Sättigung und bedingt durch die vermehrte Beschäftigung zeigen sie weniger Stereotypen (61, 78, 82).

2.2. Hintergrund der Kenntnis des porcinen Darmmikrobioms für die Verwendung des Schweins als humannahes Modelltier

Auch beim Menschen haben sich große Gemeinschaften an Kommensalen und Symbionten im GIT entwickelt. Dabei haben sich neben metabolischen Stoffwechselmerkmalen auch andere Vorteile herausgestellt (83). Die dominierenden beiden bakteriellen Phyla in der menschlichen komplexen Gemeinschaft von Mikroben im Darm bestehen aus Firmicutes und Bacteroidetes (84, 85). Diese beiden Hauptphyla zeigten sich auch ähnlich in Schweinen (40). Die Phyla Actinobacteria, Proteobacteria und Verrucomicrobia konnten zu kleineren Anteilen taxonomisch dargestellt werden. Methanobrevibacter und Methanosphaera sind die am häufigsten vorkommenden Gattungen zugehörig zu den Archaeen. *Blastocystis spp.* und Pilzgattungen wie *Candida spp.* wurden oftmals im menschlichen GIT aus der Gruppe der Mikroeu-karyoten nachgewiesen. Ebenso machen einen Teil des Mikrobioms Bakteriophagen aus (84, 85). Das menschliche Darmmikrobiom steht mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindungen wie z.B. Stoffwechselstörungen, Autoimmunerkrankungen, neurologischen Entwicklungsstörungen oder Krebs und rückt somit immer weiter in den Fokus (86). Um Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms besser verstehen zu können besteht ein dringender Bedarf an einem humannäheren experimentell zugänglichen, biomedizinischen System (37, 86-88). Die bisherigen Studien konzentrierten sich auf das murine Modell (88). Das Schwein als biomedizinisches Modell für die Humanmedizin bietet vielseitige Vorteile. *Sus scrofa* ist dem Menschen in Bezug auf Anatomie, Physiologie und Genetik sehr ähnlich. Die Körperorgane weisen entsprechende Größen, Strukturen und Funktionen auf (37, 87). Die Genomsequenz beider Spezies weist hohe Übereinstimmungen auf. Bei untersuchten Parametern des Immunsystems stimmen die der Schweine mehr mit denen des Menschen überein, als die der Maus (87). Bedingt durch die diversen Vorteile des Schweins als Modelltier im Vergleich zu Nagetieren lassen sich Erkenntnisse aus den Erforschungen von Impfstoffentwicklungen und einigen Beispielen für menschliche mikrobielle Infektionskrankheiten aus dem Tiermodell Schwein wahrscheinlicher für therapeutische Behandlungen für den Menschen vorhersagen. Das Schwein ermöglicht unterschiedliche chirurgische wie beispielweise Herzchirurgie und nicht-chirurgische Verfahren wie der Gewinnung von bronchoalveolärer Lavage, die typischerweise in der Humanmedizin angewandt werden, und an Nagetieren schwer oder gar nicht durchführbar sind (37, 87).

3. DAS AUFTRETEN DER PORZINEN EPIDEMISCHEN DIARRHOE

Die seit den 1970er-Jahren auftretende Porzine Epidemische Diarrhoe (PED) ist eine hochkontagiöse Durchfallerkrankung von Schweinen (89, 90). Sie verursacht hochgradige Entzündungen des Darmtraktes, wässrigen Durchfall, Erbrechen, Dehydratation, Inappetenz und Fieber (siehe Abbildung 5) (90, 91). Das PED-Virus betrifft alle Altersstufen mit einer Morbidität bis zu 100 %, die Mortalitätsraten sinken jedoch mit zunehmendem Alter. Bei Saugferkeln können die Verluste bis 100 % betragen (90). Verursacht wird diese Erkrankung durch ein aus der Familie der *Coronaviridae* stammendes Virus (92). Dieses ist nahe verwandt mit dem Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) und lässt sich klinisch nicht von dieser infektiösen Durchfallerkrankung unterscheiden (90, 93). Es sind überwiegend Saugferkel mit hoher Mortalität betroffen (94).

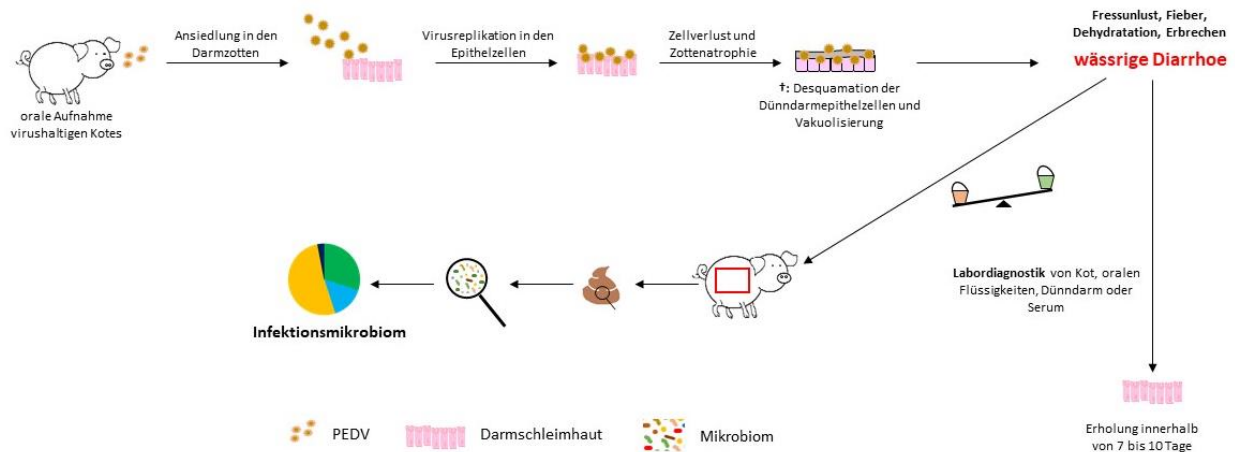


Abbildung 5. Pathophysiologie der infektiös bedingten PED (9, 19, 32, 61, 76, 95-97). Nach fäkal-oraler PEDV Aufnahme folgt eine Ansiedlung primär im Dünndarm mit der Folge einer wässrigen Diarrhoe. Das Tier zeigt die typischen klinischen Erscheinungen einer PED Erkrankung. Die Infektionszeit beträgt mehrere Tage bis sich der Darmtrakt wieder regeneriert. Mit Hilfe der Metagenomik kann im Kot neben PEDV die Zusammensetzung der Mikrobiota nachgewiesen werden.

1971 traten das erste Mal PED-Fälle bei Schweinen in England auf (89). In den darauffolgenden Jahren kam es vorwiegend in Europa und Asien in Schweinebetrieben gehäuft zu Ausbrüchen (98, 99). In den 1990er-Jahren blieb das Virus in Asien endemisch, währenddessen PED Fälle in Europa selten geworden sind und nur noch sporadisch gemeldet worden sind (100, 101). In

den Vereinigten Staaten von Amerika kam es im Frühjahr 2013 zu Ausbrüchen mit einem hochvirulenten PEDV-Stamm (98, 101-103). Dieser ist nahe verwandt mit hochvirulenten Virusstämmen aus China. Diese hochvirulenten PEDV-Stämme werden als NON-INDEL-Stämme (Virusvarianten ohne Insertionen bzw. Deletionen im für das Spike-Protein kodierenden Genomabschnitt) bezeichnet. NON-INDEL-Stämme werden im Zusammenhang mit schwersten Verläufen isoliert und beschrieben (10, 102, 104, 105). Ab Januar 2014 wurden sogenannte S-INDEL Virusstämmen (Virusvarianten mit Insertionen und Deletionen im Spike-Gen) gefunden. Diese zeigten in vielen Fällen eine niedrigere Virulenz und gingen mit mildereren Krankheitsverläufe einher (10, 101, 105-107). Auch im Südwesten Deutschlands wurde 2014 PEDV erneut in einem Schweinemast- und in zwei Ferkelerzeugerbetrieben nachgewiesen. Die Schweine aus dem Mastbetrieb zeigten klinisch gelblich, wässrigen Durchfall und Erbrechen kombiniert mit einer massiven Reduktion der Futteraufnahme, sowie Lethargie. Der Kot enthielt unverdaute Futterbestandteile, jedoch keine Beimengungen von Schleim oder Blut. In den beiden Sauenbetrieben dominierten ebenfalls die typischen klinischen Symptome wie Diarrhoe und Anorexie. In Kotproben aus den betroffenen Betrieben wurde mittels RT-qPCR das PED-Virus bestätigt. Für eine vollständige Genomsequenzierung wurden ausgewählte positive Kotproben aus allen drei Betrieben an das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems, Deutschland, übersandt. Die analysierten deutschen Stämme zeigten sehr hohe Nukleotidsequenz-Identitäten mit einer S-INDEL-Variante von PEDV (OH851) aus den Vereinigten Staaten. Die Identität zu den hochvirulenten Stämmen aus Asien und den USA war deutlich geringer (91).

In den darauffolgenden Jahren wurden immer wieder PED-Geschehen in Europa verzeichnet (106-110). Im Dezember 2014 wurde in Nordfrankreich von einem Ausbruchsgeschehen der PED berichtet. Im Maststall lag die Mortalität zwischen 3,3 % und 5,5 %, bei den Ferkeln erreichte sie nach einer Woche bis 12 % und bei den Absatzferkeln 25 %. Die daraufhin entnommenen Proben aus dem Jejunum wurden für eine NGS-Analyse herangezogen und eine vollständige Genomsequenz eines S-Gen-INDEL-Stamms des PEDV, der dem deutschen PEDV-Stamm (GER/L00719/2014) mit 99,9 % Identität ähnelt, isoliert (106). Im Januar 2015 kam es im Süden Portugals zu einem weiteren Ausbruch der PED in einem Schweinebetrieb, sowie zu Beschreibungen der Ausbreitungen von PED im Norden des Gebietes in weiteren 43 Schweinebetrieben von Januar bis April 2015. In dem Betrieb zeigten die Tiere Durchfall und hohe

Sterblichkeitsraten bei den Ferkeln. Analysen zeigten eine Identität von 99,0 % mit PEDV-Varianten aus den USA, sowie 100,0 % Identität zu den Stämmen aus Deutschland (107). Ebenso kam es in Belgien im Januar 2015 zu einem Ausbruch der PED bei Mastschweinen und einer anschließenden vollständigen Genomsequenzierung. Der isolierte Stamm BEL/15V010/2015 war am nächsten mit dem Stamm L00721 aus Deutschland aus dem Jahr 2014 sowie dem Prototyp-US-INDEL-Stamm OH851 mit 99,9 % auf Nukleotid-Basis identisch (110). Im Januar 2016 wurde von einem weiteren Fall eines PED-Ausbruchs in einem Schweinemastbetrieb in Mittelitalien berichtet. Auch hier zeigte sich im Genomvergleich eine hohe Nukleotididentität mit europäischen und amerikanischen S-INDEL-Stämmen (108). Auch in einer Publikation aus dem Jahr 2019 wurde von Ausbrüchen von PEDV in Ungarn berichtet, bei der es zu großen wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineindustrie kam und eine Rekombination im S-Gen nachgewiesen wurde (109). Diese Ergebnisse weisen nach, dass PEDV immer noch oder wieder in Europa zirkuliert (107, 110).

Kotproben sind ein geeignetes Material für den PEDV-Nachweis (98). Neben dem Nachweis Coronaviren-ähnlicher Partikel in der Elektronenmikroskopie kann das Genom der Viren mittels der real-time RT-PCR nachgewiesen werden (76, 103, 111). Mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung kann neben dem Nachweis von PEDV als pathogenem Vertreter, und der genaueren Analyse des Virusgenoms, auch die Komposition des fäkalen Viroms - als Teil des gesamten Mikrobioms - in Verbindung einer Durchfallerkrankung beim Schwein untersucht werden (9, 19, 32, 96, 97).

Kapitel III: ZIELSETZUNG

III. ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden moderne Sequenziertechniken für verschiedene Aspekte der Schweinegesundheit eingesetzt. Zielsetzung war die Optimierung der Arbeitsabläufe hinsichtlich einer interdisziplinären Nutzbarkeit und der gezielte Einsatz für die Detailcharakterisierung von Pathogenen.

Etablierung harmonisierter Probenvorbereitungsprotokolle für „Meta-Omics“ Ansätze und der Einsatz für die Charakterisierung des porcinen Darmmikrobioms

Im Rahmen der Arbeit wurden „Meta-Omics“ Ansätze (Kombination aus Metagenom, Metaproteom und Metabolom) optimiert, die eine ganzheitliche Charakterisierung des porcinen Darmmikrobioms aus gefrorenen Kotproben gestatten. Das konsolidierte Protokoll wurde im Rahmen einer ersten Studie eingesetzt und lieferte Basisdaten, die nun für nachfolgende Infektions- und Koinfektionsstudien zur Verfügung stehen.

Nutzung metagenomischer Ansätze für die Pathogencharakterisierung

Eine Fragestellung dieser Arbeit bezog sich auf den Wiedereintrag von PEDV in einem Ferkelerzeugerbetrieb in Nordwestdeutschland 2019. Metagenomische und phylogenetische Analysen sollten klären, inwieweit sich das Pathogen seit dem Ausbruchsgeschehen von 2014 verändert haben könnte und ob neue Varianten für die klinischen Fälle bei Sauen, ihren Saugferkeln und Absatzferkeln verantwortlich sind. Die infolge der PED-Infektion gewonnenen Kotproben sollten weiterhin auf der Grundlage von Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten auf zusätzlich vorkommende Viren - als Teil des porcinen Viroms - untersucht werden.

Kapitel IV: ERGEBNISSE

IV. Ergebnisse

Die Referenzen der einzelnen Publikationen im Ergebnisteil sind in der Aufmachung des jeweiligen Journals präsentiert und sind nicht im Literaturverzeichnis dieser Promotionsschrift enthalten. Die Nummerierung der Abbildungen und Tabellen entspricht der veröffentlichten Form des jeweiligen Manuskripts.

4.1. PUBLIKATION I

A Multi-Omics Protocol for Swine Feces to Elucidate Longitudinal Dynamics in Microbiome Structure and Function

Laurin Christopher Gierse, Alexander Meene, Daniel Schultz, Theresa Schwaiger, Claudia Karte, Charlotte Schröder, Haitao Wang, Christine Wünsche, Karen Methling, Bernd Kreikemeyer, Stephan Fuchs, Jörg Bernhardt, Dörte Becher, Michael Lalk, KoInfekt Study Group, Tim Urich, Katharina Riedel

microorganisms

8, 1887

November 2020

doi: 10.3390/microorganisms8121887



Article

A Multi-Omics Protocol for Swine Feces to Elucidate Longitudinal Dynamics in Microbiome Structure and Function

Laurin Christopher Gierse ^{1,†}, Alexander Meene ^{1,†}, Daniel Schultz ², Theresa Schwaiger ³, Claudia Karte ³, Charlotte Schröder ³, Haitao Wang ¹, Christine Wünsche ¹, Karen Methling ², Bernd Kreikemeyer ⁴, Stephan Fuchs ⁵, Jörg Bernhardt ¹, Dörte Becher ¹, Michael Lalk ², KoInfekt Study Group [†], Tim Urich ^{1,*} and Katharina Riedel ^{1,*}

¹ Institute of Microbiology, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 8, 17489 Greifswald, Germany; laurin.gierse@uni-greifswald.de (L.C.G.); alexander.meene@uni-greifswald.de (A.M.); haitao.wang@uni-greifswald.de (H.W.); christine.wuensche@uni-greifswald.de (C.W.); joerg.bernhardt@uni-greifswald.de (J.B.); doerte.becher@uni-greifswald.de (D.B.)

² Institute of Biochemistry, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17489 Greifswald, Germany; daniel.schultz@uni-greifswald.de (D.S.); methling@uni-greifswald.de (K.M.); lalk@uni-greifswald.de (M.L.)

³ Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Südufer 10, 17493 Greifswald, Germany; theresa.schwaiger@boehringer-ingenelheim.com (T.S.); claudia.karte@fli.de (C.K.); charlotte.schroeder@fli.de (C.S.)

⁴ Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Rostock University Medical Centre, Schillingallee 70, 18055 Rostock, Germany; bernd.kreikemeyer@med.uni-rostock.de

⁵ Division of Nosocomial Pathogens and Antibiotic Resistance, Robert Koch Institute Wernigerode, Burgstraße 37, 38855 Wernigerode, Germany; fuchss@rki.de

* Correspondence: tim.urich@uni-greifswald.de (T.U.); riedela@uni-greifswald.de (K.R.); Tel.: +49-3834-420-5904 (T.U.); +49-3834-420-5900 (K.R.)

† These authors contributed equally to the work.

‡ Authors of the KoInfekt Study Group were listed in the Author Contributions.

Received: 4 September 2020; Accepted: 27 November 2020; Published: 28 November 2020



Abstract: Swine are regarded as promising biomedical models, but the dynamics of their gastrointestinal microbiome have been much less investigated than that of humans or mice. The aim of this study was to establish an integrated multi-omics protocol to investigate the fecal microbiome of healthy swine. To this end, a preparation and analysis protocol including integrated sample preparation for meta-omics analyses of deep-frozen feces was developed. Subsequent data integration linked microbiome composition with function, and metabolic activity with protein inventories, i.e., 16S rRNA data and expressed proteins, and identified proteins with corresponding metabolites. 16S rRNA gene amplicon and metaproteomics analyses revealed a fecal microbiome dominated by *Prevotellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Clostridiaceae*. Similar microbiome compositions in feces and colon, but not ileum samples, were observed, showing that feces can serve as minimal-invasive proxy for porcine colon microbiomes. Longitudinal dynamics in composition, e.g., temporal decreased abundance of *Lactobacillaceae* and *Streptococcaceae* during the experiment, were not reflected in microbiome function. Instead, metaproteomics and metabolomics showed a rather stable functional state, as evident from short-chain fatty acids (SCFA) profiles and associated metaproteome functions, pointing towards functional redundancy among microbiome constituents. In conclusion, our pipeline generates congruent data from different omics approaches on the taxonomy and functionality of the intestinal microbiome of swine.

Keywords: biomedical model swine; gastrointestinal microbiome; integrated multi-omics; 16S rRNA gene-sequencing; metaproteomics; metabolomics

1. Introduction

The microbiome of the human intestinal tract is considered one of the main drivers for host fitness. It is involved in processes such as immune system regulation [1], nutrient utilization [2], and maintenance of intestine function [3]. Changes in the human microbiome were linked to diseases such as obesity [4], type-2 diabetes [5], colorectal cancer [6], Crohn's disease or inflammatory bowel syndrome [7,8]. Furthermore, an extrinsic short-term disturbance in the intestinal homeostasis, e.g., by antibiotic treatment, can cause long term disturbance within the commensal intestinal microbiome in a porcine model [9]. Dietary changes also shape the composition of the microbiome [10,11]. Comparison between high-fat/low-fiber (HF) and low-fat/high-fiber (LF) diets revealed a stimulating effect by LF diet on beneficial bacteria (such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.) and the production of short-chain fatty acids (SCFAs). HF content was associated with bacterial groups (e.g., *Enterobacteriaceae*) with negative impact on human health status, e.g., *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*.

Addressing the adaptation processes of the human microbiome within the intestinal environment during an infection paves the way to understanding the metabolic impact caused by bacterial and/or viral pathogens. To analyze these changes, there is urgent need for an appropriate in vivo model. Established animal models mainly focus on mice or rats. In particular, mice are widely used as the infection model for the human situation, but the use of this model is hampered by differences between humans and mice in physiology as well as in innate and adaptive immune systems. By comparison of murine and human gastrointestinal anatomy, differences become apparent, for instance the murine cecum is relatively large compared to that of humans. The colon of mice is rather smooth, not divided into different sections (ascending, transverse and descending colon) with a thin muscularis mucosae and without haustrum and taenia coli, in contrast to the human colon [12,13]. It is not only the differing body sizes and lifespans that trigger these differences, but also the occupancy of different ecological niches, resulting in evolution in different environments. Thus, interpretation of preclinical data obtained in mice is difficult [14]. Due to these limitations, alternative model systems to analyze the importance of the intestinal microbiome are required.

Pigs are becoming a popular alternative model organism for research on human health and disease [15]. This is explained by the large similarity between swine and humans in organ size, physiology, genetics, and immune cell populations [15,16]. Recently, a swine model with human microbiota was developed to better reflect the human gut [17]. Furthermore, pigs have a typical mammalian composition of the intestinal microbiome dominated by Firmicutes and Bacteroidetes, resembling that of humans [18,19]. By taking a deeper look on genus level, the intestinal tract of swine and human share several bacterial groups, such as *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Streptococcus*, *Megasphaera*, *Dialister* and *Subdoligranulum*, which were absent or very low abundant in the murine intestinal tract [19–21]. In contrast to that, the study of Ley and colleagues of the murine intestinal tract demonstrated that 85% of the observed bacterial genera were not detected in humans [22]. Dominant and highly prevalent genera of the murine intestinal tract were, for example, *Anaerostipes*, *Parabacteroides* and *Eggerthella* [23]. Higher abundant in mice, but nevertheless prevalent in humans were, for example, *Lactobacillus*, *Turicibacter* and *Alistipes* [13].

Within recent years multi-omics approaches have been applied to answer various scientific questions [24–26]. However, to the best of our knowledge, such an integrated approach has not been used to analyze the gastrointestinal microbiome of swine. Recently, different studies focusing on single omics-approaches to elucidate the intestinal microbiota of swine, e.g., by 16S rRNA gene sequencing [10,18], have been published. Tröschner-Mußotter and colleagues published the first metaproteome analysis highlighting the differences between sections from the small and large intestine of swine [27]. Furthermore, they showed that the relative abundance of proteins involved in energy production and conversion was higher in mucosa than digesta samples. In contrast, proteins involved in lipid transport and metabolism, and short-chain fatty acid production were more abundant in the digesta sample. In spite of that, Tröschner-Mußotter et al. suggested that an integrative approach combining other omics methods would facilitate the understanding of the

intestinal microbiome [27]. Combination of metaproteomic and metabolomic data allows the prediction of active metabolic pathways [28]. Moreover, metaproteomics have been employed to elucidate the influence of biological factors including disease on taxonomy and function of the microbiome [29–31]. Integrating all the available comprehensive multi-omics technologies constitutes a powerful and promising approach to investigate structure and functionality of gut microbiomes, and provides new insights into host–microbiome relationships within this complex environment that remain hidden when targeting only one single type of molecule.

In the presented study three healthy swine, which served as control group for a 30 day influenza A virus H1N1 infection, were evaluated as baseline for its potential as a biomedical model. Inter-individual variance was of special interest as it could hide infection caused shifts in the respiratory as well as intestinal microbiomes. Our study aimed to (1) establish a standardized, reproducible multi-omics pipeline, including 16S rRNA gene sequencing, metaproteomics, and metabolomics analysis, (2) to characterize and monitor the temporal structure and function of the intestinal microbiome of the uninfected animals. Subsequently, this pipeline was used to elucidate the interindividual variability of healthy animals together with the time-dependent progression of the microbiome. Established methodologies and knowledge on the natural development of the swine intestinal microbiome during the experimental time-frame are crucial for further studies elucidating the impact of infections, as well as other interventions or events in the pig's life, on the swine gastrointestinal microbiome.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Study Design

All samples for this study were provided by the Department of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management of the Friedrich-Loeffler-Institut on the Isle of Riems within the H1N1pdm09 animal experiment with the reference number 7221.3-1-035/17 [32]. For this study, three mock-infected German landrace pigs, which were eight weeks of age at the beginning of the study, were analyzed. From the third day of their lives all animals were fed the prestarter diet OlymPig (Agravis, Münster, Germany), for four weeks, additionally to the mother's milk. At the age of four weeks, they were weaned and received a mixture of the OlymPig prestarter and PANTO start (Hamburger Leistungsfutter GmbH, Hamburg, Germany) diet. Afterwards, the animals were fed the PANTO start diet only (24 days before the first sampling day). Both diets were wheat, barley and soy based. Feces were collected from three healthy swine. The sampling scheme is shown in Table 1. Individual fecal samples were collected during or within less than 30 seconds (s) after defecation over a time period of 30 days to cover longitudinal shifts (see feces homogenization and splitting procedure in Figure 1). Furthermore, digesta from intestinal sections (IS) (ileum, proximal and distal colon from three animals) were sampled during necropsy on day 30. All samples were immediately frozen on dry ice and subsequently stored at -80°C .

Table 1. Longitudinal sampling scheme and number of samples at each sampling day (d) for meta-omics analysis. Individual samples were collected from three healthy animals.

		Days after Starting Point									
		0	2 *	4 **	7	14 *	21	22	23	25	30
Fecal samples ($n = 3$)		3	2	3	3	2	3	3	3	3	3
Individual number of	16S rRNA gene analysis	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3
analyzed samples after	Metaproteomics	3	-	2	3	-	3	-	-	3	3
homogenization	Metabolomics	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3

* only two samples were available. ** low amount of sample material from one animal.

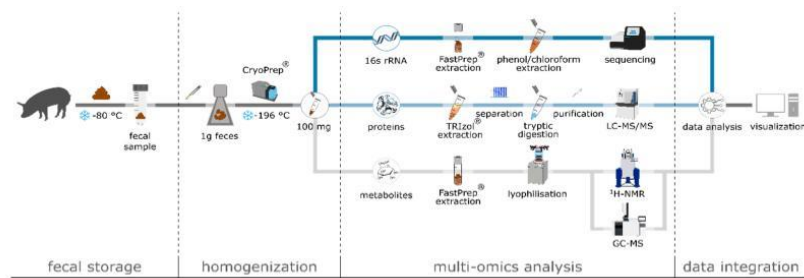


Figure 1. Integrated multi-omics workflow for 16S rRNA gene sequencing (blue), metaproteomics (light blue) and metabolomics (grey) out of the same fecal sample. After sampling fecal material was immediately placed on dry ice and stored at -80°C , followed by CryoPrep-based homogenization, optimized target-molecule extraction, and analysis, data analysis, integration and visualization.

2.2. Sample Processing

The deep-frozen samples were cut with a sterile scalpel to approximately 1 g pieces and placed into the middle of a Covaris® Tissue Tube™ TT1. To keep the fecal samples deep-frozen the tissue tube was then placed into liquid nitrogen for 60 s. The Covaris® CP02 CryoPrep™ instrument (Covaris Ltd., Brighton, UK) was set to impact level 5 and the loaded tissue tube was treated two times with liquid nitrogen for 30 s between the homogenization steps. The resulting fecal powder was then used for the three different omics-analyses described below.

2.3. DNA Extraction, 16S rRNA Gene Amplicon Library Preparation, Sequencing, and Bioinformatic Processing

Nucleic-acids were extracted from the fecal powder by a bead beating phenol-chloroform extraction protocol [33], followed by nucleic acid precipitation with 3 M Na-acetate and isopropanol. After washing with 70% v/v ethanol the resulting DNA pellets were resuspended in DEPC-treated MilliQ water for downstream applications. DNA content was quantified via Qubit™ dsDNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen™). DNA was diluted to 5 ng/μL for PCR. Amplicon and Index-PCR were performed using the V4 primer pair 515F (5'-GTG-YCA-GCM-GCC-GCG-GTA-A-3')/806R (5'-GGA-CTA-CNV-GGG-TWT-CTA-AT-3') [34,35] followed by a PCR clean up between and after both amplifications with AMPure XP beads. Libraries were quantified via Invitrogen™ Qubit™ dsDNA broad-range assay kit, normalized to a final concentration of 5 pM, denatured with NaOH and sequenced via Illumina MiSeq with an approximate output from 75,000 to 132,600 reads per sample. The sequences were submitted to European Nucleotide Archive (ENA), with the project number PRJEB39963, accession number ERP123542 and the project name "KoInfekt-multi-omics-pipeline-swine". Resulting 16S rRNA gene sequences were processed in R [36] using the dada2 pipeline-package version 1.11.1 (R-version 3.6.1). Paired-end reads were truncated to a final length of 240 bp each with a minimal overlap of 50 bp. Quality-filtered 16S rRNA gene sequences (maxN = 0, maxEE = 2, and truncQ = 2) were clustered to amplicon sequence variants (ASVs), a higher resolution analog of operational taxonomic units (OTUs) [37]. Chimeras were removed and ASVs were assigned via SILVA 132 database [38]. ASVs classified as chloroplasts or mitochondria were removed afterward. Advanced bioinformatic processing (e.g., alpha- and beta diversity, Bray-Curtis dissimilarities and non-metric multidimensional scaling) was performed in R using "vegan", "ggplot", "phyloseq", "plyr", "reshape2" packages. For statistical analysis, PERMANOVA test was performed ($p = 0.05$), using the package "vegan".

2.4. Protein Extraction and Preparation for Mass Spectrometry

1 mL TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to 100 mg of the homogenized fecal sample and mixed 3×30 s on a vortex for resuspension. Afterwards, the manufacturer's protocol based on Chomczynski, P. [39] was performed, which comprises the following steps: incubation for

5 minutes (min), addition of 0.2 mL chloroform, incubation for 3 min followed by centrifugation for 15 min at 12,000× *g* and 4 °C. Subsequently, the aqueous phase was removed, 0.3 mL ethanol was added and the samples were inverted several times, incubated for another 3 min and centrifuged for 5 min at 2000× *g* and 4 °C. The resulting phenol-ethanol supernatant was transferred in new tubes and 1 mL isopropanol was added. The mixture was incubated for 10 min, centrifuged for 10 min at 12,000× *g* and 4 °C to pellet the proteins. The supernatant was discarded. Afterwards, the pellets were washed in 0.2 mL of 0.3 M guanidine hydrochloride buffer in 95% (*v/v*) ethanol, incubated for 20 min, and centrifuged for 5 min at 7500× *g* and 4 °C. The supernatant was discarded. Washing steps were repeated 3 times. 2 mL ethanol was added to the protein pellets and mixed by vortexing, followed by incubation for 20 min, and centrifugation for 5 min at 7500× *g* and 4 °C. The supernatant was discarded and the pellets were air-dried. To solve the pellet 200 µL of 1% (*v/v*) SDS buffer was added. To ensure complete resuspension, the pellet was incubated for 3 min at 50 °C, and finally centrifuged for 10 min at 10,000× *g* and 4 °C. The resulting protein extract was transferred to a new tube. Protein concentration was measured by Pierce BCA Protein Assay [40–43].

A quantity of 30 µg of the protein extract was separated on a 4–20% Criterion TGX precast Gel (BioRad, Hercules, CA, USA) and stained with Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 as published by Neuhoff et al. [44]. Afterwards, each lane was cut in 10 pieces. Each piece was sliced into smaller blocks for tryptic digestion. To this end, gel blocks were destained using a washing solution containing 200 mM ammonium bicarbonate in 30% (*v/v*) acetonitrile, incubated in a thermo shaker for 15 min, at 900 rpm and 37 °C. The washing solution was discarded from the tube and the washing step repeated two times. Following destaining, the gel pieces were shrunk to dryness using a vacuum centrifuge. 100 µL of a 2 µg/µL trypsin stock solution (Promega, Fitchburg, WI, USA) was added to the dried gel-pieces and incubated for 15 min at RT. Excess trypsin solution was removed and samples incubated overnight at 37 °C. Subsequently, the gel blocks were covered with Aqua Bidest and incubated in an ultrasonic bath for 15 min to elute the peptides from the gel blocks. The peptide containing supernatant was transferred to new pre-lubricated reaction tubes and desalted using ZipTip purification (C18, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Afterwards, the peptide mixture was eluted in glass vials, vacuum centrifuged to dryness, resuspended 10 µL in 0.1% (*v/v*) formic acid, and stored at −20 °C.

2.5. Mass Spectrometry Analysis

The peptide containing solution was applied to an Easy-nLC II with self-packed RP C18 separation column (100 µm i.d × 200 mm length) [45] for reversed-phase chromatography (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were eluted by a binary gradient of buffers A (0.1% (*v/v*)) acetic acid and B (99.9% (*v/v*) ACN, 0.1% (*v/v*) acetic acid) over a time of 100 min at 300 nL/min, after loading and desalting them on the column. During analysis injection of the peptide mixture was kept constant. Measurements were performed with an LTQ-Orbitrap-Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source coupled on-line to the chromatographic system. Samples were measured in data-dependent manner with repeated cycles of overview scans in the Orbitrap (*r* 30,000) with the lock-mass option enabled, followed by MS/MS acquisition of the 20 most intensive precursor ions in the linear ion trap. Dynamic exclusion was enabled [46]. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [47] partner repository with the dataset identifier PXD020775.

2.6. Database Assembly and Data Analysis

For protein identification, a specific database for the gastrointestinal microbiome of swine was constructed, based on phylogenetic data obtained from 16S rRNA gene sequencing (described above). To this end, all available protein entries of the identified families were downloaded from Uniprot (version 19.11.18). To remove full-length sequence redundancy, the fasta toolkit (fastatk, version 3.0.1, <https://gitlab.com/s.fuchs/fastatk>) was used. The final database contained 29,366,730

non-redundant sequence entries. For protein identification raw files were searched against the specific database using the Mascot Daemon version 2.6.0 (Matrix Science Ltd., London, UK) with the following search parameters: enzyme: trypsin; variable modifications, methionine oxidation (+15.99 Da); maximal missed cleavages: 2; peptide charge: 2+, 3+ and 4+; peptide tolerance 10 ppm; MS/MS tolerance 0.5 Da. To validate the data, all dat files were applied to Scaffold software version 4.8.7 (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) with the LFDR scoring system and standard protein grouping. Furthermore, X!Tandem was used with a variable modification of methionine (+15.99 Da). Afterwards, a protein threshold of 95% and 1 peptide per protein were applied to the data. Proteins were considered as identified if they were present in at least two out of the two or three biological replicates. If identical peptides occur in different proteins and these proteins could not be discriminated by the MS/MS analysis they were assigned to one protein group.

2.7. Taxonomic, Functional and Statistical Analysis of Protein Groups

Taxonomic and functional protein analysis was performed using the metaproteome annotation pipeline Prophan (www.prophan.de). For taxonomic analysis, Prophan used diamond blast combined with the NCBI nr protein database (version 08.08.2018) with an e-value of 0.01, query-coverage of 0.9, and max-target-seqs of 1. For the comparison of protein and 16S rRNA derived taxonomic classification data, NCBI taxonomy was manually transcribed to SILVA taxonomy. Functional annotation was performed using the hmmscan algorithm combined with TIGRFAMs (version 16.09.2014) and eggNOG database (version 4.5.1) applying an e-value of 0.01. For statistical analysis, data was z transformed and a one-sample ANOVA test was performed (*p*-value 0.05) using MeV [48].

2.8. Extraction of Metabolites

100 mg of frozen feces powder was transferred in a FastPrep™ tube (containing lysing matrix E (MP Biomedicals™, Eschwege, Germany) and 2 mL 80% methanol and 400 µL internal standard was added. Powder was disrupted two times for 40 s with 5.5 m/s followed by centrifugation (12,400× *g*, 10 min, 4 °C). The supernatant was transferred into a new tube on ice and the FastPrep™ treatment was repeated once with ice-cold water and 500 µL dichloromethane and once with 2 mL ice-cold water. All supernatants were combined, vortexed, and stored for 10 min on ice. After centrifugation, the water/methanol containing phase was lyophilized. The lyophilized samples were resuspended in 1 mL water and split into two samples for subsequent GC-MS and ¹H-NMR analysis.

2.9. Analysis of Metabolites Using GC-MS and ¹H-NMR

For GC-MS analysis, the lyophilized extracts were derivatized and measured as previously described in Schultz et al., 2017 [49]. Details on GC-MS parameters are described in Dörries et al., 2014 [50]. Metabolites were absolutely quantified using calibration curves from standards or relative amounts were calculated using ribitol as internal standard with ChromaTOF® V4.508.0 software. Metabolite identification was done by using standard compounds. For ¹H-NMR analysis, the samples were resuspended in 500 µL PBS, vortexed, and metabolites in the supernatant were measured with a Bruker® Avance II 600 NMR spectrometer according to Schultz et al., 2017 [49]. In total, 70 different metabolites per fecal sample and time point (Figure S1) were detected by standard compounds.

2.10. Swine Feces Processing Pipeline Suitable for Multi-Omics Analyses

We compiled several individual steps from the above described methods into a feces processing pipeline suitable for multi-omics analyses (Figure 1). We highlight several of the important steps and considerations. The fecal samples were snap-frozen on dry ice immediately after collection and kept frozen at −80 °C until homogenization and extraction to prevent metabolite and protein degradation. Especially for metabolites, but also for metaproteome analysis, an immediate quenching

of protein biosynthesis and metabolism as well as constant storage at -80°C is of utmost importance [51–53]. Moreover, swine feces appear to be a highly heterogeneous sample matrix, e.g., due to incorporated indigestible fibers, which can affect the local composition of the microbiome. Therefore, proper feces homogenization prior to extraction of DNA, proteins and metabolites is crucial for generating representative data sets of microbiome composition and functionality. Different methods for homogenization were tested including (i) grinding of frozen samples with mortar and pestle, (ii) suspending samples in water, (iii) grinding thawed samples via bead mill, as well as (iv) pulverization of frozen samples via CryoPrep (data not shown). Due to the practicability of the tested homogenization methods, the best results were achieved employing the CryoPrep protocol as described in previous studies with different sample materials [54].

3. Results and Discussion

3.1. Multi-Omics Analyses of Swine Feces

The established protocol (see above Section 2.10) enables an effective, contamination-free homogenization of frozen fecal samples for subsequent integrated analysis of 16S rRNA gene sequencing, metaproteomics and metabolomics (Figure 1). Notably, only 300 mg of homogenized feces were required for this approach.

16S rRNA gene analysis. DNA from homogenized feces was extracted using an extraction protocol based on bead beating and phenol/chloroform [33], yielding approx. 130 μg DNA/g feces. TRIzol-based extraction resulted in much lower DNA yields (Table S1). Illumina Miseq amplicon sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene resulted in overall 1040 unique bacterial and archaeal ASVs, with rather uniform richness dynamics over time and a remarkably low variability between the individual fecal microbiomes (Table 2).

Notably, although richness and diversity were found to be highest on day 25, these parameters stayed relatively constant during the study period. The protocol resulted in an observed average richness of the samples of 820 ASVs (± 105 ASVs, CV = 0.13) an average Shannon index of 5.17 (± 0.15 , CV = 0.028) and an average Evenness of 0.77 (± 0.011 , CV = 0.015). These values were similar or higher as compared to other findings from swine fecal microbiomes [19]. Applying rectal swabs in a longitudinal experiment over 174 days, Wang and colleagues [55] detected up to 500 phylotypes. A fluctuation in richness was observed that depended on dietary changes. A meta-study of microbiomes from porcine GI tract and fecal samples identified 558 core OTUs [20]. This indicates a comparable microbiome diversity obtained with the presented multi-omics sample processing approach.

Metaproteomics: Initially, different extraction protocols, including a chloroform-based protocol for sewage sludge [56], an urea/thiourea-based protocol for microbial biofilms [46], a protocol combining heating and bead-beating [57], and a TRIzol-based protocol, were tested for efficiency (Table S2). The TRIzol-based protocol appeared to be most promising yielding approximately 8 mg protein per g feces on average and resulting in a mean of 4189 (± 401) protein groups (PGs) identified in 2 of 2 or 3 biological replicates for each individual sample consisting of 100 mg feces (Table 3). The large majority of the identified PGs were of bacterial origin (average 91%), followed by eukaryotic PGs (Table S3). The number of identified PGs is significantly higher than in other comparable studies on fecal samples (e.g., [11,25,27]) although the processed amount of biomass was lower. This might be explained by the use of 10 fractions instead of 1 or 3 fractions from one gel band after 1D SDS PAGE for mass spectrometry analysis. Tröschner-Mußotter and colleagues [27] identified a mean of 1780 PGs (± 153) from 5 g of colon digesta. The study of Heinritz and colleagues [11] resulted in 500 to 740 PG identifications from 300 mg of swine feces. In an integrated multi-omics study of Heintz-Buschart and colleagues [25], focusing on the intestinal microbiome of humans with type 1 diabetes, a mean of 2573 (± 1645) PGs has been identified from 200 mg stool samples.

Table 2. Microbiome alpha-diversity parameters. Average, standard deviation and coefficient of variance (CV) of richness (number of ASVs), Shannon, and Simpson index of the fecal microbiota sampled from healthy piglets along the experiment.

	Days after Sampling									
	0	2	4 *	7	14 *	21	22	23	25	30
No. of ASVs \pm sd;	831 \pm 97;	716 \pm 112;	773 \pm 36;	816 \pm 169;	859 \pm 161;	841 \pm 88; 0.1	828 \pm 80; 0.1	857 \pm 161;	901 \pm 99;	780 \pm 47;
CV	0.12	0.16	0.05	0.21	0.19			0.19	0.11	0.06
Shannon \pm sd;	5.19 \pm 0.10;	5.00 \pm 0.12;	5.10 \pm 0.13;	5.30 \pm 0.26;	5.26 \pm 0.23;	5.14 \pm 0.17;	5.13 \pm 0.13;	5.23 \pm 0.13;	5.40 \pm 0.14;	5.02 \pm 0.05;
CV	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01
Simpson \pm sd;	0.99 \pm 0.001;	0.98 \pm 0.003;	0.99 \pm 0.002;	0.99 \pm 0.003;	0.99 \pm 0.003;	0.98 \pm 0.003;	0.98 \pm 0.003;	0.98 \pm 0.003;	0.99 \pm 0.001;	0.98 \pm 0.002;
CV	0.001	0.004	0.002	0.003	0.003	0.03	0.003	0.003	0.001	0.002
Evenness \pm sd;	0.77 \pm 0.006;	0.76 \pm 0.001;	0.77 \pm 0.021;	0.79 \pm 0.015;	0.78 \pm 0.013;	0.76 \pm 0.013;	0.76 \pm 0.009;	0.78 \pm 0.016;	0.79 \pm 0.011;	0.75 \pm 0.012;
CV	0.007	0.001	0.027	0.019	0.016	0.017	0.012	0.021	0.013	0.016

* samples from only two individuals were available.

Table 3. Protein groups identified from porcine feces including total and unique (per biological replicate) numbers of PGs from individual swine feces samples at the corresponding sampling days as well as numbers of PG identified in at least 2 of 3 biological replicates.

	Days after Sampling					
	0	4 *	7	21	25	30
Pig 1	5228		6215	5038	4224	4886
unique	1091		2653	1279	960	1108
Pig 2	5342	6920	3672	5274	5450	6101
unique	1231	3303	1059	1458	2068	2217
Pig 3	6271	5686	4837	5022	5204	5298
unique	2052	2069	1539	1601	1842	1289
In 2 of 3	4797	3617	3882	4380	3970	4491

* only two biological replicates available.

Metabolomics: The homogenous fecal powder was applied to a FastPrep cell disruption followed by water/methanol/dichloromethane metabolite extraction. Different amounts of extraction volume and lysing matrices were tested. The best results were obtained using lysing matrix E and a total extraction volume of 6.5 mL water/methanol/dichloromethane (data not shown). In total, 70 different metabolites per fecal sample and time point (Figure S1) were detected, which is in good accordance with other studies focusing on feces analysis by GC-MS and NMR analysis [51,58,59]. We focused on primary metabolites, i.e., amino acids and related degradation intermediates, carbon core metabolites, fatty acids, and SCFA (Table 4). These metabolites, mainly SCFA, were also analyzed in other studies focusing on swine fecal metabolome [60–62].

Table 4. Classification of detected metabolites into main metabolic pathways.

Pathway	Number of Detected Metabolites
carbon core metabolism	13
amino acids	18
amino acid degradation	6
fatty acids	6
short-chain fatty acids	6
various	21
Σ	70

Compared to other meta-omics studies, in which the amount of samples ranged from 150 mg to 5 g [11,25,27,63,64], our protocol is based on a rather small amount of sample material, i.e., a minimum of 40, 80, and 100 mg for 16S rRNA gene sequencing, metaproteomics, and metabolomics, respectively, enabling integrated multi-omics analyses of low biomass samples.

3.2. Taxonomic Composition of the Intestinal Microbiome

Determination of microbiome composition was performed at 16S rRNA gene level, representing prokaryotes, both active and dormant, and at metaproteome level, indicative of active prokaryotes. In general, 16S rRNA gene and metaproteome profiles were similar and revealed a typical mammalian fecal microbiome consisting primarily of Firmicutes and Bacteroidetes (Figure 2) [19,65]. Furthermore, all three biological replicates at each timepoint were comparable with similar temporal dynamics. We identified the family *Prevotellaceae* as predominant (approx. 20% of 16S rRNA genes and up to ~30–35% in metaproteome), which was also described by Heinritz and colleagues [11]. Besides *Prevotellaceae* the families *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, and *Clostridiaceae* showed similar variation over time based on 16S rRNA gene sequencing and metaproteomic data. Confirming a previous finding [66], we observed a time-dependent decrease of *Lactobacillaceae*. On metaproteome level, the increasing abundances in *Prevotellaceae* at d7, as well as in *Spirochaetaceae*

and *Streptococcaceae* on d21 were directly correlated with the decrease in *Lactobacillaceae*. When the *Lactobacillaceae* recovered, the previously mentioned families started to decrease. Generally, the observed longitudinal dynamics in the taxonomic composition of microbiomes of 16S rRNA genes and protein groups were reflected in the nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analyses (Figure 3A,B, Table S4). Here, the positions of the intermediate time points (d7–d25) formed clusters in close proximity to each other, and separated from the early (d0 and d2) timepoints (Figure 3A) and from the early (d0 and d4) and late (d30) timepoints (Figure 3B). Temporal dynamics of the active microbiome over a 30-day experiment were expected in the eight weeks old piglets [55], however this intermediate shift in microbiome composition was not anticipated. Interestingly, we detected *Methanobacteriaceae* primarily at 16S rRNA gene level, but with much lower abundance in the metaproteome. This discrepancy might have been caused by primer bias and/or low identification rate for archaeal proteins in the metaproteome analysis. Furthermore, the observed variation can be explained on a biological level, regarding the different copy numbers of 16S rRNA genes in different species [67]. The large difference in the relative abundance of *Ruminococcaceae* between 16S rRNA and the taxonomic metaproteome analysis can be explained by the LCA algorithm used for the taxonomic assignment of the PGs, since many PGs of Clostridiales cannot be reliably classified on family level as *Ruminococcaceae*, thus these PGs remain classified as ‘various’. Nevertheless, the described taxonomic similarities between 16S rRNA gene and metaproteome level underline the reliability of the presented approach. Nevertheless, the described taxonomic similarities between 16S rRNA gene and metaproteome level, e.g., the appearance of *Streptococcaceae* at day 21, and the time dependent variation of *Lactobacillaceae* and *Spirochaetaceae* abundance underline the reliability of the presented approach.



Figure 2. Dynamic development of the fecal microbiota from three healthy swine over 30 days. Comparison of the relative abundances based on 16S rRNA gene and metaproteome data on phylum

level (small barplots, left) and family level. For better illustration, only families above 1% of the relative amount were shown. SILVA taxonomy was used for this comparison.

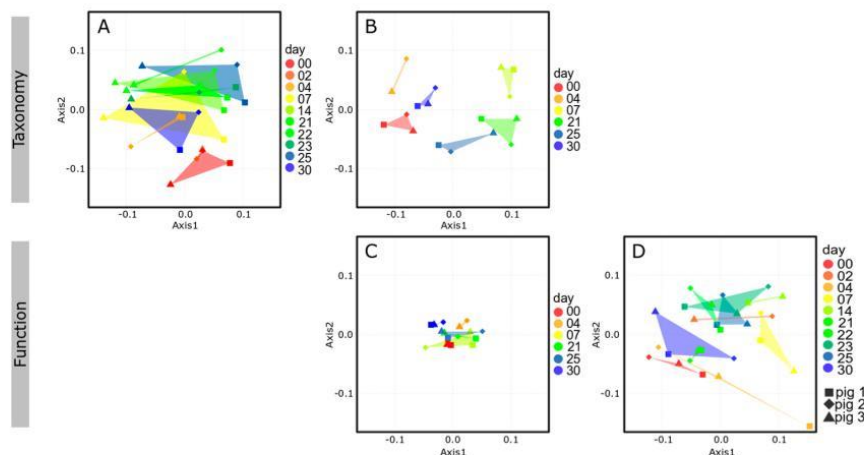


Figure 3. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plots, based on Bray–Curtis dissimilarities, of the 16S rRNA gene profile (A), metaproteome taxonomy (B), and function (C) and the metabolome (D). NMDS plots revealed similar tendencies on taxonomic level (A,B) as well as on functional level (C,D).

High Similarity of the Fecal and Colonal Microbiota

Using 16S rRNA gene amplicon sequencing, we tested if the microbiome composition of feces can serve as a reliable minimal-invasive proxy for the intestinal microbiome composition. Looft and colleagues indicated limited transferability of fecal microbiomes compared to microbiomes of the intestinal tract, due to the low number of reference studies [68].

We compared microbiomes from feces with the corresponding microbiomes from distal and proximal colon lumen, and from ileum (Figure 4, Table S5). While we saw a high accordance of the two colonal microbiomes with the fecal microbiome (without significant differences), the microbiome from ileal samples differed strongly (e.g., ileum vs. proximal colon $p = 0.006$). Furthermore, richness data indicate a high significant difference between the merged fecal- and colonal richness and the one from ileum ($p = 0.001$). The large intestine is primarily dominated by *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Lactobacillaceae*, whereas the most abundant families in the ileum are *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae* and *Peptostreptococcaceae*. This is likely due to the higher transition rates in the ileum. In the study of Deusch and colleagues [69] the fecal microbiome was also compared to intestinal microbiomes (ileum and colon) of livestock. Similar to our results, the colonal and fecal microbiomes showed a more similar composition than with the ileal microbiomes. The opportunity of taking feces as proxy for the large intestine could pave the way for (simple) predictions of the intestinal status with “minimal-invasive” sampling techniques, thus enabling follow-up of the same individuals over a longer period of time without the need for additional animals that have to be sacrificed during the experimental trial.

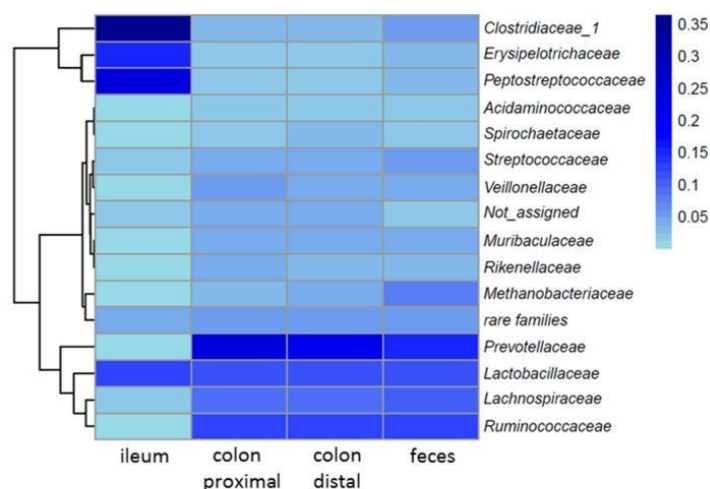


Figure 4. Fecal community of swine 1, 2, and 3 (merged) composition and comparison between the intestinal samples on family level. Color code from light blue to dark blue indicates an increasing relative abundance.

3.3. Functional Analysis of the Microbiome

Functional assignment of the identified PGs (see Materials and Methods) revealed a similar distribution for all metaproteomes at the qualitative level during the entire course of the experiment (Figure 5). More than 65% of the identified PGs were assigned to specific biological functions, which is in good accordance to the ratio of described functional annotations of the employed eggNOG database [70]. A proportion ranging from 25% to 30% of the PGs were involved in protein biosynthesis (“translation, ribosomal structure and biogenesis”) with the most prominent ribosomal proteins L and S originating from the bacterial families *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Selenomonadaceae*. Other abundant PGs belonged to the category “carbohydrate transport and metabolism” (3–7%), among them many proteins involved in glycolysis and gluconeogenesis, and “energy production and conversion” (3–5%), including proteins linked to the ATP synthase and NADH dehydrogenase complex. Moreover, proteins belonging to the functional category “post-translational modification, protein turnover, chaperones” (3–4%), “cell motility” (2–4%) and “amino acid transport and metabolism” (2–3%) were frequently identified (Figure 5, Figure S2). A detailed list of all and frequently found PGs, their taxonomical origin and functional assignment are provided in Tables S6–S8, respectively. In contrast to the time-related dynamics in the taxonomic composition of the microbiome, we observed overlaps of the NMDS clusters based on functional protein annotations (Figure 3C). In conclusion, our data suggest that albeit the taxonomic composition of the microbiome alters along the time course of the experiment, its functional potential remains rather stable compared to the taxonomy (Figure 5, Figure S2), indicating a functional redundancy among microbiome members, as proposed by others (e.g., [11]).

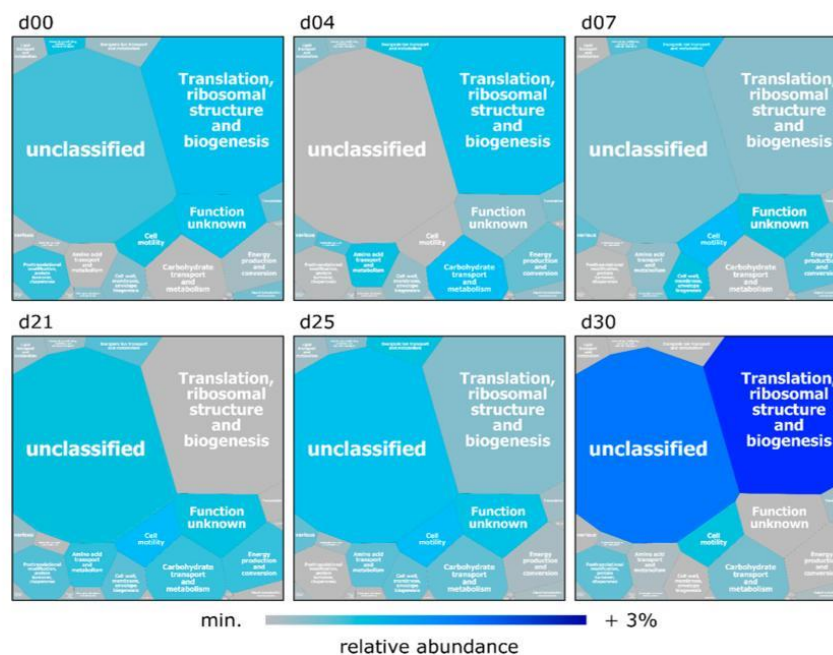


Figure 5. Voronoi Treemap illustrating functions (based on eggNOG categories) of the identified PGs from swine feces collected over 30 days. Field size represents the average over all samples minimal relative abundance over time of the corresponding category. The grey color represents the minimum expression of a functional category; dark blue fields indicate at maximum an increase of 3% in the relative abundance of the PGs at the sampling days compared to the minimum.

To identify important metabolites and to complement the metaproteomics dataset, metabolome analyses were performed. Microbial metabolites are known to affect host metabolism [71,72] and immune system [73–76] and can thus play a significant role in the health status of the host. Using $^1\text{H-NMR}$ and GC-MS 70 different metabolites were identified (Table 4). These cover a broad spectrum of metabolic intermediates, production of which seemed to be triggered by the complex host-microbiota interplay. Among the frequently identified compounds were: metabolites of the central carbon metabolism (e.g., glucose, succinate or malate), amino acids (e.g., lysine and valine, aspartate, glutamate, glycine and tyrosine), as well as palmitate and 3-hydroxybutyrate. Lysine and valine were described as preferred substrates for gut bacteria [77]. In addition, large quantities of ornithine, methionine and arginine were found, which could be catabolized in polyamines [78]. Polyamines are involved in enhancing the integrity of the intestinal barrier and are responsible for maintaining, rapid turnover and proliferation of intestinal epithelial cells. Apart from this, polyamines stimulate the production of intercellular junction proteins, which regulate the epithelial barrier function cells [79]. Interestingly, Löser and colleagues [80] have demonstrated an important role of intestinal polyamine pools during the postnatal development of the gastrointestinal tract.

Metabolite concentrations determined from feces can be regarded as rough estimation but they do not reflect the exact metabolite levels present in the colon [81]. Due to the dynamic nature of metabolites and the fact that their production is affected by internal and external factors (e.g., enzyme activity, storage or analysis method) [82], metabolome analysis revealed larger differences between the individual animals and sampling days compared to the consistent profile of functional metaproteome (Figure 3C,D). Visual overlay of metaproteomics and metabolomics data provided a detailed overview

of the metabolic activities in the microbiome (Figure S3). Remarkably, nearly all metabolites could be matched to pathways that were postulated to be active based on our metaproteomic data using the online tool IPATH3 [83].

SCFAs, central metabolites that are exclusively synthesized by different microbiome members, are known to affect the health status of the host (reviewed in, e.g., Koh et al. [72]). They have been implicated in host cell proliferation, epithelial cell integrity, histone (de-)acetylation, and G-protein coupled receptor 43 (GPR43) activation (reviewed in, e.g., Venegas et al. [84]). Our metabolome analysis revealed acetate as the most abundant SCFA, which has been also observed in various other studies (e.g., [11,23,78]). Furthermore, butyrate and propionate were detected in high concentrations (Figure 6). The detected amounts of SCFAs were comparable to a study by Heinritz and colleagues, that investigated the effects of different diets on the microbiome composition and metabolite production in 12-week-old pigs [11]. There were several studies [85–88] that measured higher SCFA concentrations in gastrointestinal tract samples from pigs. However, it is important to note that some of these studies [85,87,88] used digesta samples from different gastrointestinal sections instead of fecal samples for SCFA measurement. It was recently shown that fecal samples have lower concentrations of SCFAs, due to the fact that 95 % of the produced SCFAs were absorbed during the flow of contents through the gastrointestinal tract. Therefore, feces were known to have lower concentrations of SCFAs than the digesta of intestinal sections [89].

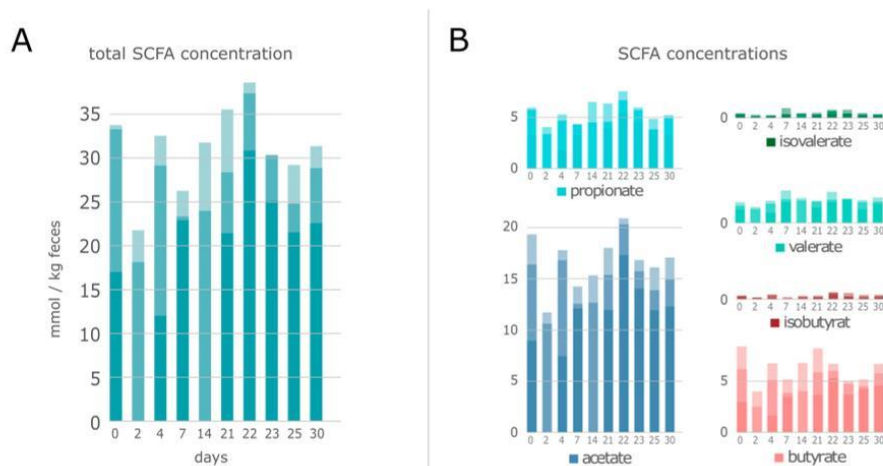


Figure 6. Total amount of all SCFAs (A) and concentrations of acetate, propionate, butyrate, valerate, isobutyrate, and isovalerate (B) of swine fecal samples from ^1H -NMR analysis over 30 days. Y-axes: SCFA concentration in mmol/kg feces; X-axes: sampling day.

In good accordance to the metabolome data, our metaproteomics study identified several key-enzymes of the SCFA production pathways, i.e., acetyl-CoA acetyltransferase, acetyl-CoA carboxylase, methylmalonyl-CoA mutase, butyrate kinase, and acetate kinase. These enzymes were expressed by different members of the orders Clostridiales, Bacteroidales, Selenomonadales, Veillonellales, and Acidaminococcales. Especially the orders Clostridiales (e.g., *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*) and Bacteroidales (e.g., *Bacteroidaceae* and *Prevotellaceae*) were known as main SCFA producers in the gut [20,72]. Albeit the amounts of acetate, propionate, butyrate and valerate reached a slight maximum at day 22 before decreasing, rather stable SCFA concentrations were observed during 30 days (Figure 6). Notably, we detected an increased abundance of the families *Streptococcaceae* and *Spirochaetaceae* while acetate and propionate were measured in higher concentrations.

4. Conclusions

In conclusion, we developed an integrated multi-omics protocol for the analysis of porcine feces, which enabled a contact-free, high-throughput homogenization of the heterogeneous fecal sample, while keeping it frozen. The homogeneous fecal powder was easily divided for the use of specialized extraction protocols for the individual omics techniques. Furthermore, we found that the taxonomic composition of feces and colon rather congruent. Therefore, we suggest that feces could be used as minimal-invasive proxy for the colon in future analyses of the gastrointestinal tract.

Applying this protocol in a typical biomedical experiment revealed congruent dynamics in microbiome structure and function but also large conformity between the different pigs. Taxonomic analysis showed a dynamic microbiome composition, which is not surprising given the successional dynamics of eight-week-old piglets over 30 days. Consequently, these high microbiome dynamics have to be considered in the design of biomedical experiments using swine.

Functional analysis via metaproteomics revealed low variability between the individual animals and at the sampling days. Through this observation, infection-related changes in the microbiome could be detected in further experiments. Integration of metaproteomic and metabolomic data resulted in large coverage of the metabolic pathways. Because main functional assignments and metabolites, such as SCFAs, were more or less stable, we suggest, that these findings point towards functional redundancy during the natural development of the individual intestinal microbiota. To verify this hypothesis, we will analyze the influence of time and infection on the functional potential of the gastrointestinal microbiome of swine in further infection studies.

Our study and the resulting multi-omics sample processing pipeline can pave the way for a more detailed analysis in the context of future porcine infection experiments with swine pathogenic microorganisms, e.g., influenza A virus or *Streptococcus suis*, as well as any other event that alters the gastrointestinal microbiome (e.g., after weaning or dietary changes). Further improvements could be beneficial for the presented approach, such as the use of additional replicates, to enable more robust statistical analyses. Furthermore, the use of metagenomics or transcriptomics instead of 16S rRNA genes to create ecosystem-specific databases for the analysis of the metaproteome would likely increase the number of identified protein groups, and might also reduce inconsistencies in the taxonomic classification between nucleic acid and protein group based profiles.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/12/1887/s1>. Figure S1: Heatmap displaying fold-change (mean amount day x /mean amount over 30 days) of detected metabolites in pig feces by GC-MS and ^1H -NMR spectroscopy. Dark blue color indicates an increased fold change of 2.5, while white color represents a decrease in the fold change to 0.3. Figure S2: Assignment of identified PGs from swine feces to functional categories based on egglog (n = 3 for sampling day 0, 7, 21, 25 and 30, n = 2 for sampling day 4). For the functional analysis of the metaproteome all identified PGs were considered, including unclassified PGs and PGs with unknown function. Figure S3: Integration of metaproteome and metabolite profiles of swine feces. Blue lines highlight the identified proteins of corresponding pathways. Detected metabolites were grouped in the categories SCFAs (teal), fatty acids (dark green), carbon core metabolism (purple), amino acids (orange), amino acid degradation (yellow), various (black), and depicted as spots. Table S1: Amount of isolated DNA from swine feces using different extraction protocols. Table S2: Average protein concentration from swine feces after employing different protein extraction protocols. Table S3: Total number of identified protein groups from swine feces at the corresponding sampling days. Table S4: nmDS data 16S metaprot metabolome. Table S5: data heatmap intestinals. Table S6: frequent families. Table S7: frequent proteins. Table S8: prophan output all protein groups.

Author Contributions: Conceptualization, L.C.G., A.M., D.S., M.L., T.U. and K.R.; methodology, L.C.G., A.M., D.S., C.W. and B.K.; software, S.F. and J.B.; data curation, L.C.G., A.M. and D.S.; formal analysis, L.C.G., A.M., D.S., H.W., J.B. and S.F.; funding acquisition, T.U. and K.R.; investigation, L.C.G., A.M., D.S., H.W. and J.B.; resources, T.S., C.K., C.S., C.W., K.M., B.K., D.B. and M.L. visualization, L.C.G., A.M. and J.B.; writing—original draft, L.C.G., A.M., D.S., M.L., T.U. and K.R.; writing—review and editing, L.C.G., A.M., D.S., T.S., C.K., C.S., H.W., C.W., K.M., B.K., S.F., J.B., D.B., M.L., T.U. and K.R. The following are members of the KolInfekt Study Group (all contributed to resources): T.M. (Thomas Mettenleiter), M.B. (Martin Beer), U.B. (Ulrike Blohm), D.H. (Dirk Höper), B.K. (Bernd Köllner), A.S. (Alexander Schäfer), J.S. (Julia Sehl) (all Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Germany) and Reiner Ulrich (R.U.) (University of Leipzig, Institute of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig, Germany). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Federal Excellence Initiative of Mecklenburg Western Pomerania and European Social Fund (ESF) Grant Kolnfekt (ESF_14-BM-A55-0006_16, ESF_14-BM-A55-0013_16, ESF_14-BM-A55-0005_16, ESF_14-BM-A55-0002_16, ESF_14-BM-A55-0008_16, ESF_14-BM-A55-0010_16).

Acknowledgments: The authors want to acknowledge all partners of the collaborative project “Kolnfekt”, that were involved in the Influenza A Virus H1N1 infection trial and made it possible to evaluate the potential of swine as a biomedical model regarding the impact of the infection on host fitness, physiology, immune response and respiratory as well as intestinal microbiomes. Furthermore, we are grateful to Daniela Zühlke and Jana Bull for their support. We thank Kerstin Kerstel, Thomas Möritz, Nicole Sinkwitz, Lukas Steinke, Ralf Henkel und Christian Loth from the Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems) for the provided animal samples. We acknowledge support for the Article Processing Charge from the DFG (German Research Foundation, 393148499) and the Open Access Publication Fund of the University of Greifswald.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kau, A.L.; Ahern, P.P.; Griffin, N.W.; Goodman, A.L.; Gordon, J.I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system: Envisioning the future. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *474*, 327–336. [\[CrossRef\]](#)
- Bäckhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L.V.; Koh, G.Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15718–15723. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hooper, L.V. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* **2001**, *292*, 1115–1118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- DiBaise, J.K.; Frank, D.N.; Mathur, R. Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **2012**, *1*, 22–27. [\[CrossRef\]](#)
- Cani, P.D.; Bibiloni, R.; Knauf, C.; Waget, A.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; Burcelin, R. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481. [\[CrossRef\]](#)
- Traskalová-Hogenová, H.; Stěpánková, R.; Kozáková, H.; Hudcovic, T.; Vannucci, L.; Tučková, L.; Rossmann, P.; Hrnčíř, T.; Kverka, M.; Zákostelská, Z.; et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **2011**, *8*, 110–120. [\[CrossRef\]](#)
- Khor, B.; Gardet, A.; Xavier, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *474*, 307–317. [\[CrossRef\]](#)
- Sartor, R.B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 577–594. [\[CrossRef\]](#)
- Littman, D.R.; Pamer, E.G. Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 311–323. [\[CrossRef\]](#)
- De Rodas, B.; Youmans, B.P.; Danzeisen, J.L.; Tran, H.; Johnson, T.J. Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 1778–1794. [\[CrossRef\]](#)
- Heinritz, S.N.; Weiss, E.; Eklund, M.; Aumiller, T.; Louis, S.; Rings, A.; Messner, S.; Camarinha-Silva, A.; Seifert, J.; Bischoff, S.C.; et al. Intestinal Microbiota and Microbial Metabolites Are Changed in a Pig Model Fed a High-Fat/Low-Fiber or a Low-Fat/High-Fiber Diet. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154329. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Justice, M.; Dhillon, P. Using the mouse to model human disease: Increasing validity and reproducibility. *Dis. Model. Mech.* **2016**, *9*, 101–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nguyen, T.L.A.; Vieira-Silva, S.; Liston, A.; Raes, J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mestas, J.; Hughes, C.C.W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2731–2738. [\[CrossRef\]](#)
- Meurens, F.; Summerfield, A.; Nauwynck, H.; Saif, L.; Gerds, V. The pig: A model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 50–57. [\[CrossRef\]](#)
- Niemann, H.; Petersen, B. The production of multi-transgenic pigs: Update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.* **2016**, *25*, 361–374. [\[CrossRef\]](#)

17. Wang, M.; Donovan, S. Human Microbiota-Associated Swine: Current Progress and Future Opportunities. *ILAR J.* **2015**, *56*, 63–73. [CrossRef]
18. Isaacson, R.E.; Kim, H.B. The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Heal. Res. Rev.* **2012**, *13*, 100–109. [CrossRef]
19. Holman, D.B.; Brunelle, B.W.; Trachsel, J.; Allen, H.K. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* **2017**, *2*, e00004-17. [CrossRef]
20. Kim, H.B.; Borewicz, K.; White, B.A.; Singer, R.S.; Sreevatsan, S.; Tu, Z.J.; Isaacson, R.E. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.* **2011**, *153*, 124–133. [CrossRef]
21. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [CrossRef] [PubMed]
22. Ley, R.E.; Bäckhed, F.; Turnbaugh, P.; Lozupone, C.A.; Knight, R.D.; Gordon, J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11070–11075. [CrossRef] [PubMed]
23. Wang, J.; Lang, T.; Shen, J.; Dai, J.; Tian, L.; Wang, X. Core Gut Bacteria Analysis of Healthy Mice. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 887. [CrossRef] [PubMed]
24. Roume, H.; Muller, E.E.L.; Cordes, T.; Renaut, J.; Hiller, K.; Wilmes, P. A biomolecular isolation framework for eco-systems biology. *ISME J.* **2013**, *7*, 110–121. [CrossRef]
25. Heintz-Buschart, A.; May, P.; Laczny, C.C.; Lebrun, L.A.; Bellora, C.; Krishna, A.; Wampach, L.; Schneider, J.G.; Hogan, A.; De Beaufort, C.; et al. Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 16180. [CrossRef]
26. Deusch, S.; Seifert, J. Catching the tip of the iceberg—Evaluation of sample preparation protocols for metaproteomic studies of the rumen microbiota. *Proteomics* **2015**, *15*, 3590–3595. [CrossRef]
27. Tröschner-Mußotter, J.; Tilocca, B.; Stefanski, V.; Seifert, J. Analysis of the Bacterial and Host Proteins along and across the Porcine Gastrointestinal Tract. *Proteomes* **2019**, *7*, 4. [CrossRef]
28. Yang, L.-N.; Pu, J.-C.; Liu, L.-X.; Wang, G.-W.; Zhou, X.-Y.; Zhang, Y.-Q.; Liu, Y.-Y.; Xie, P. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis Revealed Second Messenger System Disturbance in Hippocampus of Chronic Social Defeat Stress Rat. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 247. [CrossRef]
29. Kan, J.; Hanson, T.E.; Ginter, J.M.; Wang, K.; Chen, F. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Syst.* **2005**, *1*, 7. [CrossRef]
30. Erickson, A.R.; Cantarel, B.L.; Lamendella, R.; Darzi, Y.; Mongodin, E.F.; Pan, C.; Shah, M.; Halfvarson, J.; Tysk, C.; Henrissat, B.; et al. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49138. [CrossRef]
31. Kolmeder, C.; De Been, M.; Nikkilä, J.; Ritamo, I.; Mättö, J.; Valmu, L.; Salojärvi, J.; Palva, A.; Salonen, A.; De Vos, W.M. Comparative Metaproteomics and Diversity Analysis of Human Intestinal Microbiota Testifies for Its Temporal Stability and Expression of Core Functions. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29913. [CrossRef] [PubMed]
32. Schwaiger, T.; Sehl, J.; Karte, C.; Schäfer, A.; Hühr, J.; Mettenleiter, T.C.; Schröder, C.; Köllner, B.; Ulrich, R.; Blohm, U. Experimental H1N1pdm09 infection in pigs mimics human seasonal influenza infections. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0222943. [CrossRef] [PubMed]
33. Berry, D.; Schwab, C.; Milinovich, G.; Reichert, J.; Ben Mahfoudh, K.; Decker, T.; Engel, M.; Hai, B.; Hainzl, E.; Heider, S.; et al. Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *ISME J.* **2012**, *6*, 2091–2106. [CrossRef] [PubMed]
34. Parada, A.E.; Needham, D.M.; Fuhrman, J.A. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* **2015**, *18*, 1403–1414. [CrossRef]
35. Apprill, A.; McNally, S.; Parsons, R.; Weber, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **2015**, *75*, 129–137. [CrossRef]
36. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019; Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 7 January 2020).
37. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef]

38. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
39. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **1993**, *15*, 532–537.
40. Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B.; Klenk, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
41. Wiechelman, K.J.; Braun, R.D.; Fitzpatrick, J.D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 231–237. [[CrossRef](#)]
42. Kessler, R.J.; Fanestil, D.D. Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 138–142. [[CrossRef](#)]
43. Brown, R.E.; Jarvis, K.L.; Hyland, K.J. Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 136–139. [[CrossRef](#)]
44. Neuhoﬀ, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Teeling, H.; Fuchs, B.M.; Becher, D.; Klockow, C.; Gardebrecht, A.; Bennke, C.M.; Kassabgy, M.; Huang, S.; Mann, A.J.; Waldmann, J.; et al. Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science* **2012**, *336*, 608–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lassek, C.; Burghartz, M.; Chaves-Moreno, D.; Otto, A.; Hentschker, C.; Fuchs, S.; Bernhardt, J.; Jauregui, R.; Neubauer, R.; Becher, D.; et al. A Metaproteomics Approach to Elucidate Host and Pathogen Protein Expression during Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTIs). *Mol. Cell. Proteom.* **2015**, *14*, 989–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Howe, E.; Holton, K.; Nair, S.; Schlauch, D.; Sinha, R.; Quackenbush, J. MeV: MultiExperiment Viewer. In *Biomedical Informatics for Cancer Research*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 267–277.
49. Schultz, D.; Schlüter, R.; Gerth, U.; Lalk, M. Metabolic Perturbations in a *Bacillus subtilis* clpP Mutant during Glucose Starvation. *Metabolites* **2017**, *7*, 63. [[CrossRef](#)]
50. Dörries, K.; Schlueter, R.; Lalk, M. Impact of Antibiotics with Various Target Sites on the Metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7151–7163. [[CrossRef](#)]
51. Deda, O.; Chatziioannou, A.C.; Fasoula, S.; Palachanis, D.; Raikos, N.; Theodoridis, G.A.; Gika, H.G. Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1047*, 115–123. [[CrossRef](#)]
52. Matysik, S.; Le Roy, C.I.; Liebisch, G.; Claus, S.P. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *57*, 244–255. [[CrossRef](#)]
53. Smirnov, K.S.; Maier, T.V.; Walker, A.; Heinzmann, S.S.; Forcisi, S.; Martinez, I.; Walter, J.; Schmitt-Kopplin, P. Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int. J. Med. Microbiol.* **2016**, *306*, 266–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wylezich, C.; Papa, A.; Beer, M.; Höper, D. A Versatile Sample Processing Workflow for Metagenomic Pathogen Detection. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, X.; Tsai, T.; Deng, F.; Wei, X.; Chai, J.; Knapp, J.; Apple, J.; Maxwell, C.V.; Lee, J.A.; Li, Y.; et al. Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* **2019**, *7*, 109. [[CrossRef](#)]
56. Kuhn, R.; Benndorf, D.; Rapp, E.; Reichl, U.; Palese, L.; Pollice, A. Metaproteome analysis of sewage sludge from membrane bioreactors. *Proteomics* **2011**, *11*, 2738–2744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tanca, A.; Palomba, A.; Pisanu, S.; Deligios, M.; Fraumene, C.; Manghina, V.; Pagnozzi, D.; Addis, M.F.; Uzzau, S. A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome* **2014**, *2*, 49. [[CrossRef](#)]
58. Wu, J.; An, Y.; Yao, J.; Wang, Y.; Tang, H. An optimised sample preparation method for NMR-based faecal metabolomic analysis. *Analyst* **2010**, *135*, 1023–1030. [[CrossRef](#)]

59. Gao, X.; Pujos-Guillot, E.; Martin, J.-F.; Galan, P.; Juste, C.; Jia, W.; Sebedio, J.-L. Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization. *Anal. Biochem.* **2009**, *393*, 163–175. [\[CrossRef\]](#)
60. Tan, S.C.; Chong, C.W.; Yap, I.K.S.; Thong, K.L.; Teh, C.S.J. Comparative assessment of faecal microbial composition and metabonome of swine, farmers and human control. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8997. [\[CrossRef\]](#)
61. Zhang, D.; Liu, H.; Wang, S.; Zhang, W.; Wang, J.; Tian, H.; Wang, Y.; Ji, H. Fecal Microbiota and Its Correlation With Fatty Acids and Free Amino Acids Metabolism in Piglets After a Lactobacillus Strain Oral Administration. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 785. [\[CrossRef\]](#)
62. Wen, X.; Wang, L.; Zheng, C.; Yang, X.; Ma, X.; Wu, Y.; Chen, Z.; Jiang, Z. Fecal scores and microbial metabolites in weaned piglets fed different protein sources and levels. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 31–36. [\[CrossRef\]](#)
63. Leser, T.D.; Amenuvor, J.Z.; Jensen, T.K.; Lindecrone, R.H.; Boye, M.; Møller, K. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: The Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 673–690. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Weiss, E.; Aumiller, T.; Spindler, H.K.; Rosenfelder, P.; Eklund, M.; Witzig, M.; Jørgensen, H.; Knudsen, K.E.B.; Mosenthin, R. Wheat and barley differently affect porcine intestinal microbiota. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *96*, 2230–2239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Le Sciellour, M.; Renaudeau, D.; Zemb, O. Longitudinal Analysis of the Microbiota Composition and Enterotypes of Pigs from Post-Weaning to Finishing. *Microorganisms* **2019**, *7*, 622. [\[CrossRef\]](#)
66. Heinritz, S.N.; Mosenthin, R.; Weiss, E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr. Res. Rev.* **2013**, *26*, 191–209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Stoddard, S.F.; Smith, B.J.; Hein, R.; Roller, B.R.; Schmidt, T.M. rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D593–D598. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Looft, T.; Allen, H.K.; Cantarel, B.L.; Levine, U.Y.; O Bayles, D.; Alt, D.P.; Henrissat, B.; Stanton, T.B. Bacteria, phages and pigs: The effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* **2014**, *8*, 1566–1576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Deusch, S.; Tilocca, B.; Camarinha-Silva, A.; Seifert, J. News in livestock research—Use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
70. Powell, S.; Szklarczyk, D.; Trachana, K.; Roth, A.; Kuhn, M.; Muller, J.; Arnold, R.; Rattei, T.; Letunic, I.; Doerks, T.; et al. eggNOG v3.0: Orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D284–D289. [\[CrossRef\]](#)
71. Rowland, I.; Gibson, G.R.; Heinken, A.; Scott, K.P.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K.M. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1–24. [\[CrossRef\]](#)
72. Koh, A.; De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Bäckhed, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **2016**, *165*, 1332–1345. [\[CrossRef\]](#)
73. Rooks, M.G.; Garrett, W.S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 341–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Blacher, E.; Levy, M.; Tatirovsky, E.; Elinav, E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 572–580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Postler, T.S.; Ghosh, S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 110–130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Kim, C.H. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology* **2018**, *154*, 220–229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Macfarlane, G.T.; Allison, C.; Gibson, S.A.W.; Cummings, J.H. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *64*, 37–46. [\[CrossRef\]](#)
78. Miller-Fleming, L.; Olin-Sandoval, V.; Campbell, K.; Ralser, M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 3389–3406. [\[CrossRef\]](#)
79. Liu, L.; Guo, X.; Rao, J.N.; Zou, T.; Xiao, L.; Yu, T.; Timmons, J.A.; Turner, D.J.; Wang, J.-Y. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2009**, *296*, C801–C810. [\[CrossRef\]](#)
80. Löser, C.; Eisel, A.; Harms, D.; Fölsch, U.R. Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* **1999**, *44*, 12–16. [\[CrossRef\]](#)

81. Besten, G.D.; Van Eunen, K.; Groen, A.K.; Venema, K.; Reijngoud, D.-J.; Bakker, B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 2325–2340. [\[CrossRef\]](#)
82. Gil Quintero, A.; Siegel, D.; Permentier, H.; Reijngoud, D.-J.; Dekker, F.W.; Bischoff, R. Stability of energy metabolites—An often overlooked issue in metabolomics studies: A review. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 2156–2169. [\[CrossRef\]](#)
83. Darzi, Y.; Letunic, I.; Bork, P.; Yamada, T. iPath3.0: Interactive pathways explorer v3. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W510–W513. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Parada Venegas, D.; de La Fuente, M.K.; Landskron, G.; González, M.J.; Quera, R.; Dijkstra, G.; Harmsen, H.J.M.; Faber, K.N.; Hermoso, M.A. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Canibe, N.; Steien, S.H.; Overland, M.; Jensen, B.B. Effect of K-difformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 2123–2133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Poulsen, A.-S.R.; de Jonge, N.; Nielsen, J.L.; Højberg, O.; Lauridsen, C.; Cutting, S.M.; Canibe, N. Impact of *Bacillus* spp. spores and gentamicin on the gastrointestinal microbiota of suckling and newly weaned piglets. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207382. [\[CrossRef\]](#)
87. Guerra-Ordaz, A.A.; Molist, F.; Hermes, R.G.; Gómez de Segura, A.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Tchorzewska, M.A.; Collins, J.W.; Pérez, J.F.; Martín-Orúe, S.M. Effect of inclusion of lactulose and *Lactobacillus plantarum* on the intestinal environment and performance of piglets at weaning. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2013**, *185*, 160–168. [\[CrossRef\]](#)
88. Molist, F.; de Segura, A.G.; Gasa, J.; Hermes, R.G.; Manzanilla, E.G.; Anguita, M.; Pérez, J.F. Effects of the insoluble and soluble dietary fibre on the physicochemical properties of digesta and the microbial activity in early weaned piglets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2009**, *149*, 346–353. [\[CrossRef\]](#)
89. Sakata, T. Pitfalls in short-chain fatty acid research: A methodological review. *Anim. Sci. J.* **2019**, *90*, 3–13. [\[CrossRef\]](#)

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary materials

An integrated multi-omics protocol for swine feces reveals congruent longitudinal dynamics in microbiome structure and function

A Multi-Omics Protocol for Swine Feces to Elucidate Longitudinal Dynamics in Microbiome Structure and Function

Laurin Christopher Gierse ^{1,†}, Alexander Meene ^{1,†}, Daniel Schultz ², Theresa Schwaiger ³, Claudia Karte ³,

Charlotte Schröder ³, Haitao Wang ¹, Christine Wünsche ¹, Karen Methling ², Bernd Kreikemeyer ⁴, Stephan Fuchs ⁵, Jörg Bernhardt ¹, Dörte Becher ¹, Michael Lalk ², KoInfekt Study Group [‡], Tim Urich ^{1,*} and Katharina Riedel ^{1,*}

¹ Institute of Microbiology, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 8, 17489 Greifswald, Germany; laurin.gierse@uni-greifswald.de (L.G.); alexander.meene@uni-greifswald.de (A.M.); haitao.wang@uni-greifswald.de (H.W.); christine.wuensche@uni-greifswald.de (C.W.); joerg.bernhardt@uni-greifswald.de (J.B.); doerte.becher@uni-greifswald.de (D.B.)

² Institute of Biochemistry, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17489 Greifswald, Germany; daniel.schultz@uni-greifswald.de (D.S.); methling@uni-greifswald.de (K.M.); lalk@uni-greifswald.de (M.L.)

³ Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Südufer 10, 17493 Greifswald, Germany; theresa.schwaiger@boehringer-ingelheim.com (T.S.); claudia.karte@fli.de (C.K.); charlotte.schroeder@fli.de (C.S.)

⁴ Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Rostock University Medical Centre, Schillingallee 70, 18055 Rostock, Germany; bernd.kreikemeyer@med.uni-rostock.de

⁵ Division of Nosocomial Pathogens and Antibiotic Resistance, Robert Koch Institute Wernigerode, Burgstraße 37, 38855 Wernigerode, Germany; fuchss@rki.de

* Correspondence: tim.urich@uni-greifswald.de (T.U.); riedela@uni-greifswald.de (K.R.); Tel.: +49-383-442-059-04 (T.U.); +49-383-442-059-00 (K.R.)

† These authors contributed equally to the work.

‡ Authors of the KoInfekt Study Group were listed in the Author Contributions

Received: 4 September 2020; Accepted: 27 November 2020; Published: 28 November 2020

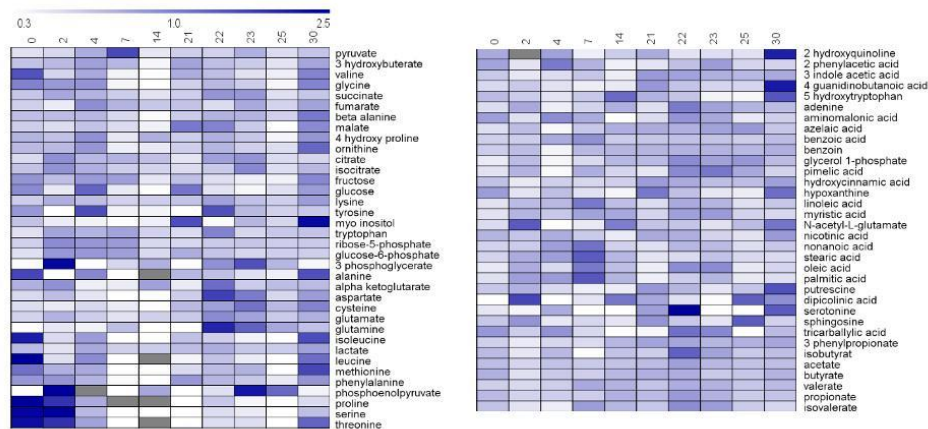


Figure S1: Heatmap displaying fold-change (mean amount day x / mean amount over 30 days) of detected metabolites in pig feces by GC-MS and ^1H -NMR spectroscopy. Dark blue color indicates an increased fold change of 2.5, while white color represents a decrease in the fold change to 0.3.

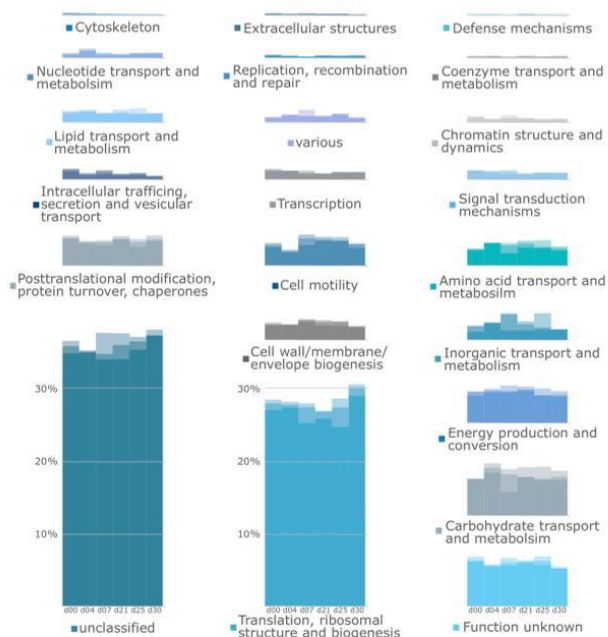


Figure S2: Assignment of identified PGs from swine feces to functional categories based on eggNOG ($n = 3$ for sampling day 0, 7, 21, 25 and 30, $n = 2$ for sampling day 4). For the functional analysis of the metaproteome all identified PGs were considered, including unclassified PGs and PGs with unknown function.

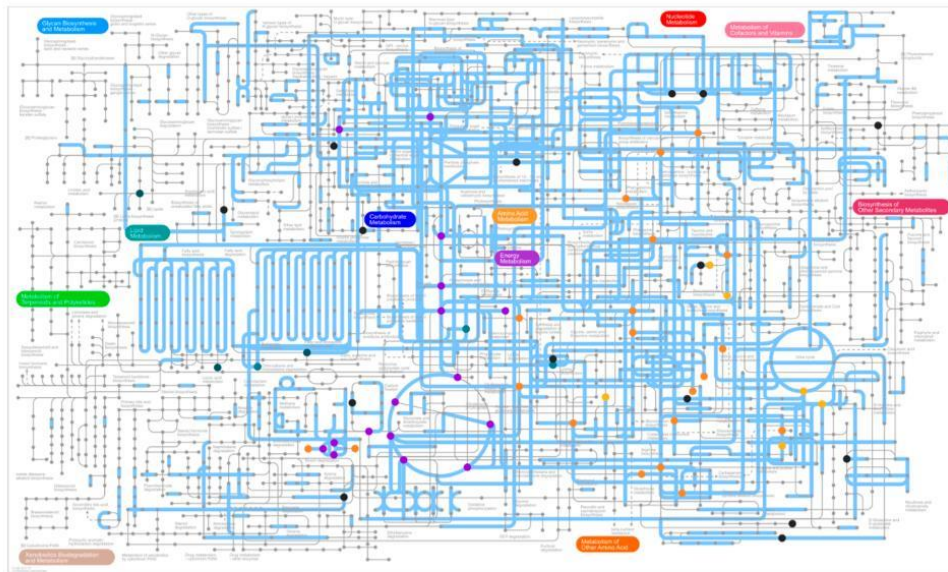


Figure S3: Integration of metaproteome and metabolite profiles of swine feces. Blue lines highlight the identified proteins of corresponding pathways. Detected metabolites were grouped in the categories SCFAs (teal), fatty acids (dark green), carbon core metabolism (purple), amino acids (orange), amino acid degradation (yellow), various (black), and depicted as spots.

Table S1: Amount of isolated DNA from swine feces using different extraction protocols.

	tested extraction protocols for 16S rRNA sequencing	
	TRIzol-based	phenol-chloroform
amount DNA [μg / g feces]	10.68	50.11
SD [μg / g feces]	0.52	2.16

Table S2: Average protein concentration from swine feces after employing different protein extraction protocols.

	tested extraction protocols for metaproteomics			
	sewage sludge	urea/thiourea	heating and bead-beating	TRIzol- based
amount protein [μg / μl]	4.67	1.27	1.64	5.76
SD [μg / μl]	0.57	0.21	0.14	0.39

Table S3: Total number of identified protein groups from swine feces at the corresponding sampling days.

	days after starting point					
	0	4*	7	21	25	30
Total	4560	3454	3705	4230	3817	4348
Bacteria	4062	3194	3386	3924	3506	4055
Eukaryota	403	214	267	228	234	223
Archaea	31	11	4	10	12	20
Various	52	28	37	56	54	34
Unclassified	12	7	11	12	11	16

*only two biological replicates available

Supplementary Materials online unter: <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/12/1887/s1>

Table S4: nmbs data 16S metaprot metabolome.

Table S5: data heatmap intestinals.

Table S6: frequent families.

Table S7: frequent proteins.

Table S8: prophane output all protein groups.

4.2. PUBLIKATION II

Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019

Claudia Karte, Nadine Platje, Johannes Bullermann, Martin Beer,
Dirk Höper, Sandra Blome

BMC Veterinary Research

16:329

September 2020

doi: 10.1186/s12917-020-02548-4

CASE REPORT

Open Access

Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019



Claudia Karte¹, Nadine Platje², Johannes Bullermann³, Martin Beer¹, Dirk Höper¹ and Sandra Blome^{1*} 

Abstract

Background: Porcine epidemic diarrhea (PED) is a viral enteric disease of pigs. It affects all age classes of animals but lethality is mainly seen in suckling piglets. After its first appearance in England in 1971, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) has spread worldwide. While sporadic outbreaks prevailed in Europe, the disease had high impact in Asia. Following particularly severe outbreaks in 2011, high impact cases were also reported in the United States and neighboring countries in 2013. Subsequently, outbreaks were also reported in several European countries including Germany. These outbreaks were less severe. This case report describes a recent case of PED re-emergence in Germany and the sequence analyses of the causative PEDV.

Case presentation: In spring 2019 5 years after re-introduction of PED into Central Europe, a piglet-producer in northwestern Germany experienced an outbreak that affected sows, their suckling piglets, and weaners. After initial confirmation of PEDV by real-time RT-PCR, fecal material and small intestine samples from affected pigs were subjected to metagenomic analyses employing next-generation sequencing. Phylogenetic analyses showed high identities among the PEDV sequences obtained from samples of different animals and a close relation to recent strains from Hungary and France. Compared to the PEDV strains analyzed in 2014, genetic drift could be confirmed. Changes were mainly observed in the spike protein encoding S gene segment. In addition, metagenomic analyses showed multiple Picobirnavirus reads in all investigated samples.

Conclusion: This case report shows that PEDV is still circulating in Europe. The causative strains are moderately virulent and are still closely related to the so-called INDEL strains reported previously in Europe, including Germany. However, a genetic drift has taken place that can be seen in a novel cluster comprising strains from Germany, Hungary and France in 2019. Relevance and impact of the detected Picobirna sequences need further investigations.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), Next-generation sequencing, Phylogenetic analysis, Metagenomics

* Correspondence: sandra.blome@fli.de

¹Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Suedufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Greifswald, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Porcine epidemic diarrhea (PED) is an acute and highly contagious enteric disease of swine that results in severe enteritis, diarrhea, vomiting, and dehydration. Especially in suckling pigs, lethality can be very high [1–3]. The causative agent, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), is an enveloped positive single-stranded RNA virus that belongs to the family *Coronaviridae*, genus *Alphacoronavirus* [4]. The complex coronavirus particles are pleomorphic and possess club-shaped surface projectors [5]. The length of the genome ranges from 27 to 31 kilobases [6]. Coronaviruses have a low tenacity [7] but are shed in high amounts and are thus easily transmitted by the fecal-oral route [8].

After its first recognition in the 1970s in Europe [7, 9], the disease caused considerable economic losses especially in Asia, where the disease remains endemic [10, 11]. In Europe, the disease disappeared quickly, and from most countries, only very sporadic cases were reported over the last three decades. After reports from Asia, that a new PEDV variant caused considerable losses [12, 13], that highly virulent PEDV variant emerged also in the United States (US) in 2013, with swine farms experiencing explosive epidemics affecting all age classes of animals, with up to 95% mortality in suckling pigs [2, 14].

In 2014, several cases of PED were also reported from southern and western Germany. In most cases, fattening pigs were affected showing high morbidity with almost non-existent mortality [15]. However, some breeding herds reported high mortality rates with up to 85% losses in suckling piglets [1]. Similar outbreaks were observed in several other Central European countries including France, The Netherlands, Italy, Slovenia, Belgium, Romania, Portugal, Spain, and Austria [16–23].

The characterization of the involved virus strains revealed that so-called S-INDEL variants of the virus were involved in central Europe, which, in contrast to the highly virulent NON-INDEL strains from Asia and the USA, are characterized by deletions and insertions in the spike protein encoding S gene [23]. In the majority of cases, the S-INDEL variants are associated with milder PED courses.

In the absence of reporting obligations, and following the confirmation that the PEDV strains in the EU did not belong to the highly virulent NON-INDEL type, notification and broader follow-up of cases decreased. However, sporadic outbreaks, sometimes with severe problems to get rid of the disease, were still reported from all production systems from different regions of Germany and other countries (personal communications and unpublished data). From this time, PEDV sequence information is largely missing.

When a new wave of PED struck a piglet producer in northwestern Germany in 2019, questions were raised to what extent the virus might have changed and if a new emerging variant was causing the clinical case in sows, piglets and weaners. Here, we report on the clinical presentation and the whole-genome sequencing of the causative 2019 PEDV strain.

Case presentation

Case farm characteristics

The affected piglet producer is located in northwestern Germany. The farm keeps approximately 350 sows in seven groups (50 sows each), and has a total of 2200 piglet rearing places (1000 on site and 1200 in a leased farm). On the premise, sows and piglets are kept in the same building complex. The farm also includes a fattening unit with 1500 fattening slots. This unit is in close proximity to the above-mentioned units but has its own building with a hygiene lock. Three other pig farms are in the radius of 500 m around the holding.

Prior to the disease event, the farm recorded 33 weaned piglets per sow and year with suckling losses below 10%. Loss in piglet rearing and fattening was < 2%. The animals were routinely screened for enteric pathogens and only rotavirus types A and C were detected every now and again (rotavirus type C only very sporadically). The farm was unsuspecting for dysentery and was tested negative for TGEV and PDCoV prior, during and after the disease event.

The routinely applied immunization scheme included maternal vaccinations against colibacillosis, oedema disease, and necrotic enteritis. Depending on the infection pressure, rotavirus A vaccines were used in gilts. Piglets received vaccinations against porcine circovirus type 2 (PCV-2), mycoplasma, and Shiga toxin producing *E. coli*. Sows in integration and reproduction received additional vaccination e.g. against porcine respiratory and reproductive syndrome virus, influenza virus, and parvovirus.

Clinical presentation and interventions

In spring 2019, massive diarrhea occurred in sows and suckling pigs. At first, nursing sows (60% of the sows in the unit) in the farrowing unit showed inappetence and shortly afterwards mushy diarrhoea. Fever or increased temperature were not detected. The sows recovered completely after three to 4 days. The suckling piglets, which were about 14 days old, showed the first signs of diarrhea two to 3 days after the mothers. About 70% of the litters of this first affected farrowing group showed diarrhea and losses rose to 10% (see Table 1). Immediate investigations confirmed PEDV (RT-qPCR from fecal samples and organs). Sick piglets were treated with commercial electrolyte solution and additional water supply was given to sows. To increase maternal immunity,

Table 1 Clinical presentation, morbidity and mortality in sows and piglets following the introduction of PEDV in the holding. Abbreviations: pp.: post partum, pn: post natum, ap: ante partum, wk: week

Group	Sows (morbidity; diarrhea)	Piglets (morbidity; diarrhea)	Suckling piglet losses (mortality, total)	Piglet rearing losses (mortality, total)
1 (wk 15/2019)	approx. 60% disease about 10 days pp	approx. 70% disease about 14 days pn	10% increased proportion of puny little animals or rather underweight weaners	approx. 5%
2 (wk 17/2019)	approx. 80–90% disease about 0–1 days pp. (bradytocia)	approx. 100% disease approx. 3 days pn (tend to have more weak live suckling piglets than usual)	29.2% increased proportion of puny little animals respectively underweight weaners	approx. 10%
3 (wk 20/2019)	approx. 70% diarrhea in the waiting stable, disease approx. 1–2 weeks ap	approx. 80% disease approx. 3–5 days pn	20.2% increased proportion of puny little animals respectively underweight weaners	approx. 8%

infection was enforced in the waiting area. Weaned piglets with secondary infections received antibiotic treatment.

In total, three farrowing groups (sows and suckling pigs) showed clinical signs of PED and increased loss rates in suckling pigs (10 to 30%). Morbidity reached 60 to 90% in sows and 70 to 100% in piglets (see Table 1). Some of the weaned piglets also showed diarrhea, wasting, and growth retardation. The overall losses in piglet rearing rose to 5 to 10% (details see Table 1).

In the fourth farrowing group (approx. eight weeks after the first clinical signs) no clinical signs indicative for PED were recorded and up to now no further PED suspicions arose. In autumn, five suckling piglets were randomly selected and subjected to necropsy and PED screening. All samples were negative for PEDV. In the connected fattening unit, no PED signs were recorded at any time. Serological checks in the sow rearing unit (separate building) gave negative results.

During the disease event, intensive cleaning and disinfection was carried out in the farrowing unit, on drive-ways, in the waiting areas, and all related stables. Disinfectants were chosen in accordance with the list recommended by the Germany Veterinary Society (DVG) for enveloped viruses. Purchase of gilts was stopped and replaced by self-remounting.

Follow-up investigations showed that neighboring farms were also affected by PED shortly before the onset in the described farm.

Laboratory findings

Upon initial confirmation of PED by a private laboratory, fecal samples from five sows and feces and intestines from two affected piglets were sent to the Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) for further analyses and next-generation sequencing. Ribonucleic acids were extracted

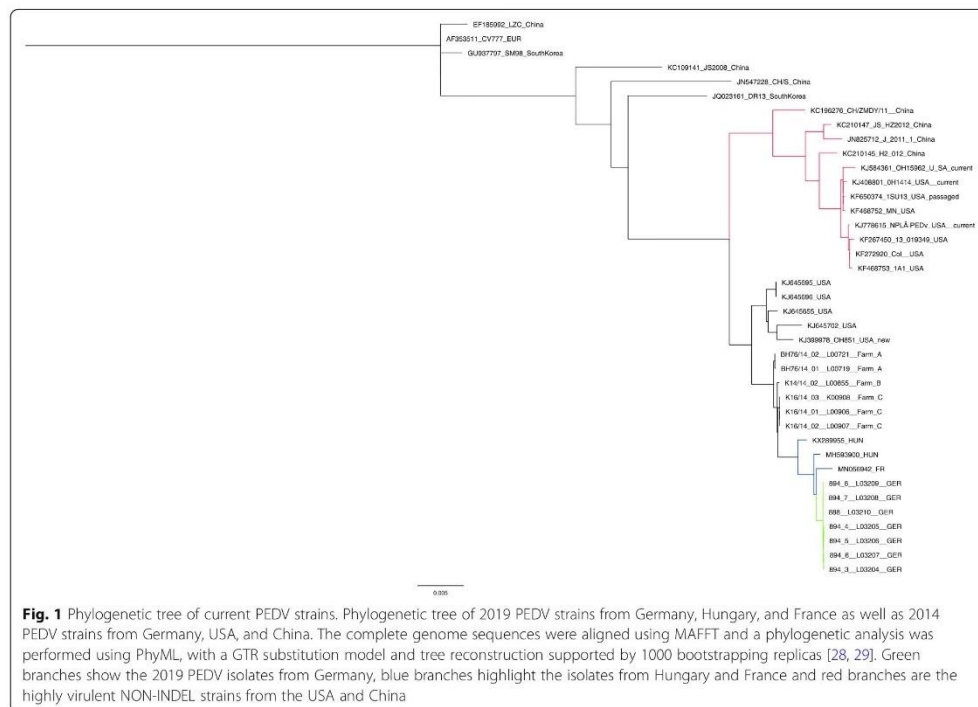
from fecal samples or supernatants from homogenized intestines using Trizol Reagent (Life Technologies, Darmstadt, Germany) in combination with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and DNase digestion on the spin column. All RNAs were confirmed to be PEDV positive by RT-qPCR [24, 25].

Subsequently, all samples were subjected to whole genome sequencing and metagenomic analyses using the Illumina MiSeq platform as previously described [26]. In brief, nucleic acids were processed into shotgun DNA libraries and then deep-sequenced. The resulting raw data was taxonomically classified using the Software pipeline RIEMS [27]. The obtained sequence reads were assembled to determine the genomes in full length. All sequences are available from the INSDC databases under study accession PRJEB38314.

With the help of the Geneious Prime software suite (v. 2019.2.3; Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), phylogenetic analyses were performed (for details see legend Fig. 1). The genomes originating from the reported German case form a new and distinct cluster within the S-INDEL strains (see Fig. 1). Close relatives are three virus strains reported in 2019, two from Hungary [16] (accessions MH593900 and KX289955) and one from France (accession MN056942).

Identity among the new German PEDV strains was almost 100% (> 99.9%) whereas identities of > 98.8% were found with regard to the Hungarian and French sequences. Comparing the German strains from 2014 with the German strains detected in 2019, identities are higher than 99.5%.

Comparisons between German prototype strains from 2014 (the first reported strain, BH76/14-01_L00719_Farm A) and 2019 (894_3_L03204_GER) show high similarities in the nucleotide sequence (see Supplementary Figure 1). In total, 135 nucleotide exchanges are



observed over the entire coding region. Of these, 64 nucleotide exchanges are located in the spike protein encoding S gene, especially in its 5' end, and additional mutations scattered over this coding region. All sequences derived from the case farm showed 100% identity in the S gene. Compared to French and Hungarian strains reported in 2019, identities of > 99.5% were found, while German strains from 2014 were app. 98.5% identical (see Supplementary Table 1). Highly virulent NON-INDEL strains from China and the USA were more distantly related showing identities of app. 95%.

The RNA-shotgun sequencing approach allowed metagenomic analyses using RIEMS. In this analysis, several reads were classified taxonomically as *Picobirnaviridae* sequences. Multiple reads of the RNA-dependent RNA-polymerase gene as well as the gene segment encoding the capsid were found in the fecal but not the intestine samples.

Discussion and conclusions

Porcine epidemic diarrhea can have a tremendous impact on the pig industry as was seen in the US following the introduction of PEDV in 2013 [2, 29]. Critical losses occurred especially in piglet rearing companies and the

losses impacted the whole pork industry [15, 29]. Following the devastating outbreaks on the American continent, re-emergence of PEDV was also reported from Europe after intensified surveillance [23]. However, here, strains of lower virulence were circulating and the reporting and follow-up of cases abated quickly despite ongoing cases. One reason for the subsiding of official follow-up is that PED is neither notifiable nor reportable but still has impact on trade and reputation. Against this background, most farmers had no interest to make their cases public. Thus, official and published information on the German PED situation in general and viral evolution in particular is missing roughly from 2016 onwards.

When PEDV was introduced in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019, clinical disease and losses were rather disturbing and the farmer and responsible veterinarian initiated a closer follow-up. One hypothesis for the observed impact was a change in virulence and thus, next-generation sequencing was employed to test this hypothesis. Our data show that the causative virus strains are still S-INDEL variants with close relationship to those found in 2014 and the following years. However, viral evolution has taken place and the drift gave rise to a new cluster that comprises recent

strains from Germany, Hungary, and France. Given the accordant drift, one can speculate that PEDV is still circulating in Europe. There is no indication that these variants have a higher virulence per se. The previously observed variation seems still present.

The affected farm described in this report was finally able to control the outbreak by forced infection in the waiting unit of sows, biosecurity and strict cleaning and disinfection. Yet, the history of PED in neighboring fattening farms also shows that the virus was able to enter the farm and room for improvement was given in veterinary hygiene and biosafety. The exact route of introduction remained unclear.

Supplementary studies into the metagenomic data set showed picobirnaviral sequences in the fecal material. Picobirnaviruses are non-enveloped double-stranded RNA viruses. They are bisegmented with segment one consisting of 2.3 to 2.6 kilobases and segment two of 1.5 to 1.9 kilobases [30]. Picobirnaviruses are often associated with cases of gastroenteritis or infections in the respiratory tract [31]. The role in diarrhea diseases in piglets is unclear, since picobirnaviruses were found in piglets with and without diarrhea [32]. The transmission is fecal-oral [33] and these viruses have so far been detected mainly in feces in various species [30, 33]. Impact and relevance of these findings remains to be clarified by future studies.

In conclusion, PED re-emerged in northwestern Germany in 2019 leading to high morbidity and substantial impact in a piglet-producing farm. The causative virus strains are still S-INDEL variants but a genetic drift occurred since 2014. This drift is accordant with the evolution in other European countries. The relevance of picobirnavirus detections in fecal samples from PEDV-positive animals remains unclear.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02548-4>.

Additional file 1: Supplementary Figure 1. Whole genome comparison of prototype German PEDV strains from 2014 and 2019. The figure compares the first reported PEDV strain from Germany in 2014 and a representative strain taken from the current outbreak in 2019. Over the whole genome, 135 nucleotide differences are observed that are mainly located in the S-gene (64 out of 135). It can be seen in the magnification of the S-gene and its 5' end, that changes, i.e. small insertions and nucleotide differences, are mainly located there. **Supplementary Table 1.** S gene sequence identities of recent PEDV genomes. The S gene sequences were aligned using MAFFT from the Geneious Prime software suite (v. 2019.2.3; Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) and sequence identities were exported from Geneious. Green color indicates the strains from the case farm in Germany in 2019, blue sequences mark the PEDV strains from Hungary and France reported in 2019, and representative NON-INDEL strains from the USA and China are highlighted in red.

Abbreviations

PEDV: Porcine epidemic diarrhea virus; PED: Porcine epidemic diarrhea; RT-qPCR: Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction;

kbp: Kilobase pairs; RIEMS: Reliable Information Extraction of Metagenomic Sequence datasets; MAFFT: Multiple alignment using fast Fourier transform; PhyML: Phylogeny software based on the maximum likelihood principle; GTR: General Time Reversible

Acknowledgements

The authors thank Patrick Zitzow, Robin Brandt and Ulrike Kleinert for technical assistance.

Authors' contributions

CK performed next-generation sequencing and was a major contributor in writing the manuscript, NP and JB collected and analyzed clinical data, MB interpreted the overall dataset and critically revised the manuscript, SB conceived the study, assisted in interpreting the data and contributed in writing the manuscript, DH analyzed and interpreted whole-genome data and contributed to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by Federal Excellence Initiative of Mecklenburg Western Pomerania and European Social Fund (ESF) Grant KolInfekt (ESF_14-BM-A55-00xx_16). The Excellence Initiative covered consumables for next-generation sequencing and the personnel costs of the major contributor (CK). Open access funding provided by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

Sequence information was deposited at the European Nucleotide Archive (ENA) under study ID PRJEB38314 (Accessions LR812928; LR812932; LR812927; LR812929; LR812930; LR812926; and LR812931). Additional metadata are available from the authors upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The sample material was submitted to the Friedrich-Loeffler-Institut for enhanced diagnostics and was taken by the responsible farm veterinarian in the context of the health monitoring program of the respective farm (in accordance with the Regulation on hygiene requirements for the keeping of pigs; online available at <http://www.gesetze-im-internet.de/schluhthvgv/>). In Germany, every keeper of pigs must have his herd supervised by a veterinarian as part of the on-farm inspections, this includes clinical and laboratory checks to maintain and improve the health status of the herd. No permissions were necessary to collect the mainly non-invasive specimens. The farmer approved in-detail analyses of the PED case and shipment of samples (verbal agreement with the responsible veterinarian). All procedures were carried out in accordance with the relevant regulations.

Consent for publication

The owner of the case farm approved submission of the report. All authors have approved submission of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Suedufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Greifswald, Germany. ²Tierarztpraxis Wietmarschen, Wietmarschen, Germany. ³Tierarztpraxis Bethen, Cloppenburg, Germany.

Received: 15 May 2020 Accepted: 27 August 2020

Published online: 10 September 2020

References

1. Stadler J, Zoels S, Fux R, Hanke D, Pohlmann A, Blome S, Weissenböck H, Weissenbacher-Lang C, Ritzmann M, Ladinig A. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res*. 2015;11:142. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0454-1>.
2. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*. 2013;25:649–54. <https://doi.org/10.1177/1040638713501675>.

3. Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Yang X, Chen L, Chang HT, Zhao J, Wang CQ. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. *Arch Virol*. 2013;158:2487–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1767-7>.
4. Nicola Decaro. Alphacoronavirus: The Springer Index of Viruses: New York, 2011, ISBN 978-0-387-95918-4.
5. Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like Partiele Associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*. 1978;243–7.
6. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre; Hans-Joachim Selbitz, Uwe Truyen, Peter Valentin-Weigand, Ed., 10th; Enke, 2015, ISBN 9783830412625.
7. Pospischil A, Stuedli A, Kuipel M. Diagnostic notes: update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod*. 2002;10(2):81–5.
8. Moser L. Verlaufuntersuchung über die Ausscheidung von porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) und die Serokonversion nach Feldinfektion bei Saugferkeln und Mastschweinen; 2017.
9. Thomas Henniger, Bernd Andreas Schwarz. Porcine epidemic diarrhoea (PED) – Neuaustrübe in deutschen mastschweinebeständen. *Tierärztl. Umschau* 69, 000–000 (2014) 2014.
10. Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatharakasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnien A, Urairong K, Kitikoon P, Choojai P, Kedkovid R, Teankum K, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1112–5. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081256>.
11. Oldham J. Pig Farming. Letter to the editor; 1972. p. 72–3.
12. Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014. <https://doi.org/10.3201/eid2005.140195>.
13. Li W, Li W, Gong P, Zhang C, Yang J, Zhang X, Li J. The prevalence of intestinal trichomonads in Chinese pigs. *Vet Parasitol*. 2015;211:12–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.028>.
14. Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon K-J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*. 2014;52:234–43. <https://doi.org/10.1128/JCM.02820-13>.
15. Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, Blome S, Pohlmann A, Schirmeier H, Beer M, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):933–6. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141165>.
16. Valkó A, Albert E, Cságola A, Varga T, Kiss K, Farkas R, Rónai Z, Biksi I, Dán Á. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhoea virus in Hungary - short communication. *Acta Vet Hung*. 2019;67:307–13. <https://doi.org/10.1556/004.2019031>.
17. Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F, Blanchard Y. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc*. 2015;3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00535-15>.
18. Theuns S, Conceição-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmaretz LMB, Roukaerts DM, Acar DD, Heylen E, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in belgium, january 2015. *Genome Announc*. 2015;3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00506-15>.
19. Dortmans JCFM, Li W, van der Wolf PJ, Buter GJ, Franssen PJM, van Schaik G, Houben M, Bosch BJ. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) introduction into a naive Dutch pig population in 2014. *Vet Microbiol*. 2018;221:13–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.014>.
20. Mesquita JR, Hakze-van der Honing R, Almeida A, Lourenço M, van der Poel WHM, Nascimento MSJ. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis*. 2015;62(5):586–8. <https://doi.org/10.1111/tbed.12409>.
21. Steinigl A, Fernández SR, Stoiber F, Pikalo J, Sattler T, Schmoll F. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Vet Res*. 2015;11:310. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0624-1>.
22. Boniotti MB, Papetti A, Bertasio C, Giacomini E, Lazzaro M, Cerioli M, Faccini S, Bonilauri P, Vezzoli F, Lavazza A, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus in Italy: disease spread and the role of transportation. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65:1935–42. <https://doi.org/10.1111/tbed.12974>.
23. Hanke D, Pohlmann A, Sauter-Louis C, Höper D, Stadler J, Ritzmann M, Steinigl A, Schwarz B-A, Akimkin V, Fux R, et al. Porcine epidemic diarrhea in Europe: in-detail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology. *Viruses*. 2017;9. <https://doi.org/10.3390/v9070177>.
24. Blome S, Petrov A. Genomnachweis des Porzinen Epidemischen Diarrhoe Virus (PEDV) mittels Real-time RT-PCR. *AVID-Methodensammlung: AVID- Methode VIR03*; 2016.
25. Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, Torremorell M. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res*. 2014;45:73. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0073-z>.
26. Wylezich C, Papa A, Beer M, Höper D. A versatile sample processing workflow for metagenomic pathogen detection. *Sci Rep*. 2018;8:13108. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31496-1>.
27. Scheuch M, Höper D, Beer M. RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:69. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0503-6>.
28. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(14):3059–66.
29. Perri AM, Poljak Z, Dewey C, Harding JCS, O'Sullivan TL. Factors associated with time to elimination of porcine epidemic diarrhea virus in individual Ontario swine herds based on surveillance data. *Front Vet Sci*. 2019;6:139. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00139>.
30. Ganesh B, Masachessi G, Mladenova Z. Animal Picobirnavirus. *Virusdisease*. 2014;25:223–38. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0207-y>.
31. Malik YS, Ghosh S. Etymologia: Picobirnavirus. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(1): 89. <https://doi.org/10.3201/eid2601.EI2601>.
32. Wilburn L, Yodmeeklin A, Kochjan P, Saikruang W, Kumthip K, Khamrin P, Maneekarn N. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. *Arch Virol*. 2017;162:1061–6. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3190-3>.
33. Ganesh B, Bányai K, Kanungo S, Sur D, Malik YS, Kobayashi N. Detection and molecular characterization of porcine picobirnavirus in feces of domestic pigs from Kolkata, India. *Indian J Virol*. 2012;23:387–91. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0106-z>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

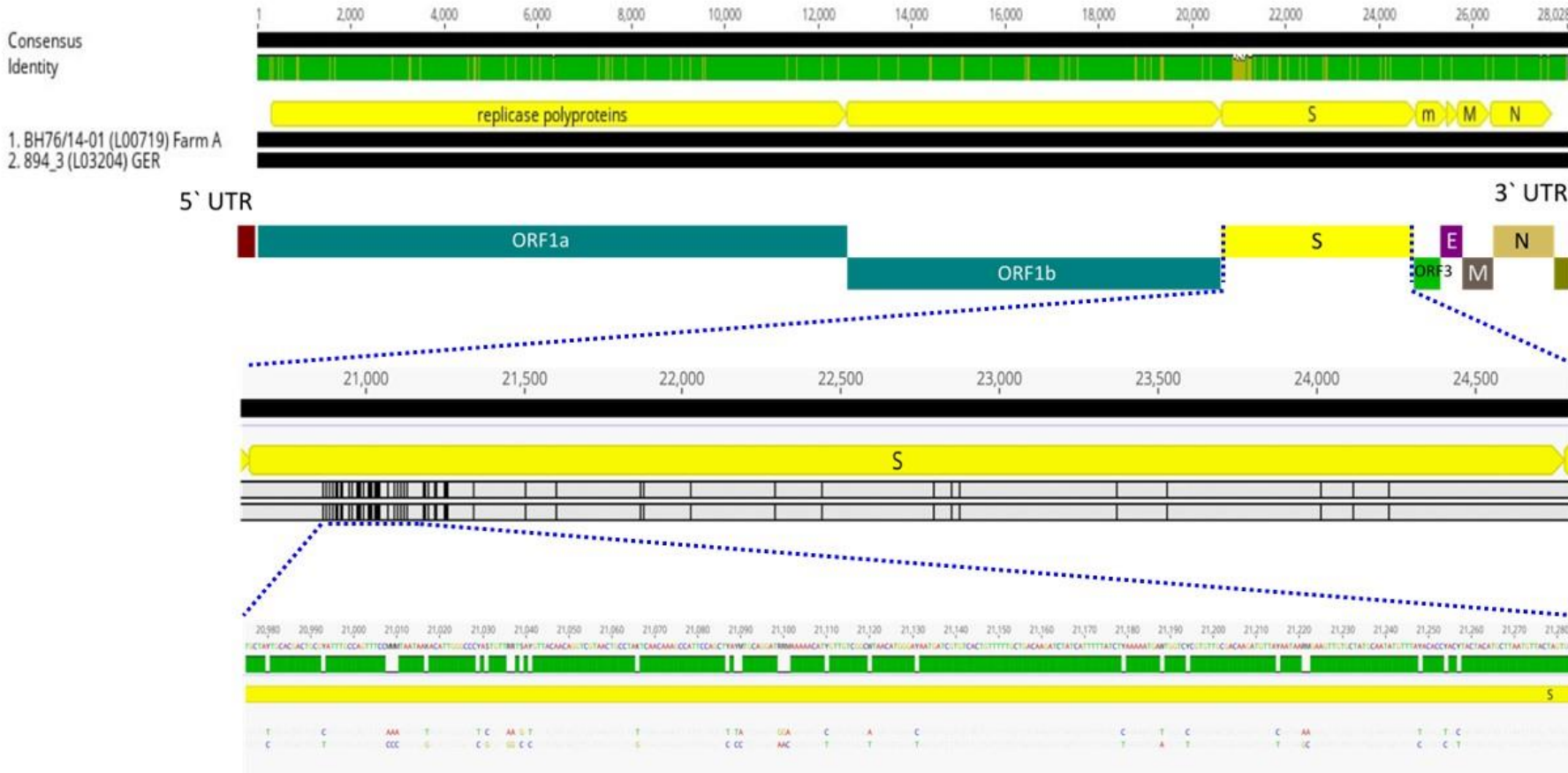
Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Supplementary figure 1: Whole genome comparison of prototype German PEDV strains from 2014 and 2019

The figure compares the first reported PEDV strain from Germany in 2014 and a representative strain taken from the current outbreak in 2019. Over the whole genome, 135 nucleotide differences are observed that are mainly located in the S-gene (64 out of 135). It can be seen in the magnification of the S-gene and its 5' end, that changes, i.e. small insertions and nucleotide differences, are mainly located there.

Supplementary table 1: S gene sequence identities of recent PEDV genomes.

The S gene sequences were aligned using MAFFT from the Geneious Prime software suite (v. 2019.2.3; Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) and sequence identities were exported from Geneious. Green color indicates the strains from the case farm in Germany in 2019, blue sequences mark the PEDV strains from Hungary and France reported in 2019, and representative NON-INDEL strains from the USA and China are highlighted in red.

	JQ023161	AF353511	KC109141	JN547228	MH593900	L03204	L03207	L03210	L03206	L03209	L03205	L03208	MN056942	KX289955	KJ399978	LC0908	LC0907	LC0906	LC0855	LC0721	LC0719	KJ408801	KC196276	KC210145	JN825712
JQ023161_DR13_SouthKorea_2011		98.48	98.31	97.35	96.05	96.12	96.12	96.12	96.12	96.12	96.12	96.12	95.89	96.29	97.04	96.99	96.99	96.99	97.04	97.16	97.16	94.50	94.43	94.60	94.82
AF353511_CV7777_EUR_1977	98.48		96.89	96.34	94.89	94.97	94.97	94.97	94.97	94.97	94.97	94.97	94.74	95.13	95.79	95.74	95.74	95.74	95.79	95.91	95.91	93.57	93.52	93.69	93.93
KC109141_J52008_China_2008	98.31	96.89		96.70	95.30	95.38	95.38	95.38	95.38	95.38	95.38	95.38	95.15	95.47	96.12	96.10	96.10	96.10	96.15	96.22	96.22	93.71	93.54	93.83	93.93
JN547228_CH/5_China_2011	97.35	96.34	96.70		94.85	94.92	94.92	94.92	94.92	94.92	94.92	94.92	94.69	94.99	95.74	95.69	95.69	95.69	95.74	95.86	95.86	93.35	93.26	93.50	93.59
MH593900_HUN_2019	96.05	94.89	95.30	94.85		99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.70	99.57	98.17	98.53	98.53	98.53	98.48	98.43	98.43	95.54	95.61	95.15	95.37
894_3 (L03204) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_6 (L03207) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_10 (L03210) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_5 (L03206) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	100.00	99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_8 (L03209) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	100.00	99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_4 (L03205) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00	99.73	99.55	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
894_7 (L03208) GER_2019	96.12	94.97	95.38	94.92	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		99.73	99.56	98.19	98.51	98.51	98.51	98.46	98.46	98.46	95.56	95.63	95.22	95.44
MN056942_FR_2019	95.89	94.74	95.15	94.69	99.70	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73		99.38	98.01	98.37	98.37	98.37	98.33	98.28	98.28	95.38	95.45	95.00	95.21
KX289955_HUN_2019	96.29	95.13	95.47	94.99	99.57	99.56	99.56	99.56	99.56	99.56	99.55	99.56	99.38		98.41	98.77	98.77	98.77	98.72	98.65	98.65	95.75	95.82	95.37	95.58
KJ399978_OH851_USA_new_2014	97.04	95.79	96.12	95.74	98.17	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.19	98.01	98.41		99.52	99.52	99.52	99.57	99.59	99.59	96.26	95.99	95.58	95.85
K16/14-03 (L00908) Farm C_2014	96.99	95.74	96.10	95.69	98.53	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.37	98.77	99.52	100.00	100.00	100.00	99.90	99.78	99.78	96.02	96.04	95.63	95.85
K16/14-02 (L00907) Farm C_2014	96.99	95.74	96.10	95.69	98.53	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.37	98.77	99.52	100.00	100.00	100.00	99.90	99.78	99.78	96.02	96.04	95.63	95.85
K16/14-01 (L00906) Farm C_2014	96.99	95.74	96.10	95.69	98.53	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.37	98.77	99.52	100.00	100.00	100.00	99.90	99.78	99.78	96.02	96.04	95.63	95.85
K14/14-02 (L00855) Farm B_2014	97.04	95.79	96.15	95.74	98.48	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.33	98.72	99.57	99.90	99.90	99.90	99.83	99.83	99.83	96.06	96.04	95.63	95.90
BH76/14-02 (L00721) Farm A_2014	97.16	95.91	96.22	95.86	98.43	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.28	98.65	99.59	99.78	99.78	99.78	99.83	99.83	100.00	96.09	96.06	95.66	95.92
BH76/14-01 (L00719) Farm A_2014	97.16	95.91	96.22	95.86	98.43	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.46	98.28	98.65	99.59	99.78	99.78	99.78	99.83	99.83	100.00	96.09	96.06	95.66	95.92
KJ408801_OH1414_USA_current_2014	94.50	93.57	93.71	93.35	95.54	95.56	95.56	95.56	95.56	95.56	95.56	95.56	95.38	95.75	96.26	96.02	96.02	96.02	96.06	96.09	96.09	96.09	99.30	99.18	99.35
KC196276_CH/ZMDV/11_China_2011	94.43	93.52	93.54	93.26	95.61	95.63	95.63	95.63	95.63	95.63	95.63	95.63	95.45	95.82	95.99	96.04	96.04	96.04	96.04	96.06	96.06	99.30	99.18	99.35	99.50
KC210145_H2012_China_2012	94.60	93.69	93.83	93.50	95.15	95.22	95.22	95.22	95.22	95.22	95.22	95.22	95.00	95.37	95.58	95.63	95.63	95.63	95.66	95.66	95.66	99.18	98.87	99.50	99.50
JN825712_J-2011-1_China_2011	94.82	93.93	93.93	93.59	95.37	95.44	95.44	95.44	95.44	95.44	95.44	95.44	95.21	95.58	95.85	95.85	95.85	95.85	95.90	95.92	95.92	99.35	99.16	99.50	99.50

Kapitel V: DISKUSSION

V. DISKUSSION

Der Einsatz moderner Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren in Verbindung mit aktuellen bioinformatischen Methoden erlaubt es heute, in kürzester Zeit das Metagenom bzw. das Mikrobiom einer beliebigen Probe zu erfassen und so Informationen über die Zusammensetzung von Mikroorganismen inklusive Pathogenen sowie damit zusammenhängende Krankheitsgeschehen zu erhalten (9, 18, 19, 76, 112). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Methoden eingesetzt, um das Darmmikrobiom des Schweins zu charakterisieren. Die Erhebung erster Basisdaten stand dafür im Mittelpunkt, um zukünftig Veränderungen des Darmmikrobioms im Zuge von Infektionskrankheiten zu analysieren. Hierzu wurde zunächst ein neuartiges Probenvorbereitungsprotokoll etabliert, um umfassende und vergleichende „Meta-Omics“ Ansätze (Kombination aus Metagenom, Metaproteom und Metabolom) aus dem gleichen Probenmaterial zu ermöglichen (Publikation I).

In weiteren Analysen wurde unter Verwendung der Metagenomanalyse auch ein porcines Pathogen, das PEDV, untersucht. Im Rahmen eines PEDV-Ausbruchsgeschehens in einem Ferkelerzeugerbetrieb in Nordwestdeutschland wurden umfassende Metagenomdaten aus Probenmaterial des Jahres 2019 erhoben, um hier Rückschlüsse auf die Genetik des Erregers sowie die mit der Infektion einhergehenden Veränderungen des Darmmikrobioms zu erhalten (Publikation II).

Etablierung harmonisierter Probenvorbereitungsprotokolle für „Meta-Omics“ Ansätze und der Einsatz für die Charakterisierung des porcinen Darmmikrobioms

In diesem Studienteil stand die Protokolloptimierung für vergleichende „Meta-Omics“ Analysen (Kombination aus Metagenom, Metaproteom und Metabolom) aus tiefgefrorenen porcinen Kotproben im Mittelpunkt. Die Methodik wurde im Weiteren eingesetzt, um Struktur und Funktion des Mikrobioms zu erfassen und ein porcines Basisdarmmikrobiom zu beschreiben.

Es gelang in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen, ein Protokoll zu etablieren, das die effektive und kontaminationsfreie Homogenisierung der tiefgefrorenen Kotproben mittels des

sogenannten „cryoPREP®“-Instruments und die nachfolgende integrierte Analyse von Metagenom/16S rRNA, Metaproteom und Metabolom erlaubte.

Der Schlüssel des Verfahrens ist dabei die Aufarbeitung mit der cryoPREP®-Methode, die in Abbildung 6 kurz dargestellt ist, die generell einen sehr guten Probenaufschluss, auch bei sehr resistenten Probenstrukturen, gewährleistet. Wylezich et al. haben 2018 hierzu ein erstes Protokoll zur Probenaufarbeitung für diagnostische Metagenom-Analysen von Human-, Tier- und Lebensmittelproben beschrieben, das als Grundlage für die Weiterentwicklung diene. Ziel dieser Verfahren ist eine weitgehend matrixunabhängige Probenaufschlussmethode für die Extraktion von Nukleinsäuren hoher Qualität. Es wurden hierzu mehrere Aufschlussmethoden hinsichtlich ihrer Eignung und Freisetzung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Probenmaterialien vergleichend getestet: Mit dem sog. „TissueLyser“ bei Raumtemperatur sowie dem „Mikro-Dismembrator“ und dem „cryoPREP®“ mit tiefgefrorenem Material. Dabei zeigte das „TissueLyser“-Verfahren bei den Testversuchen mit Schweinekot den stärksten RNA-Abbau und man erhielt nur sehr kurze RNA-Fragmente. Die besten Ergebnisse wurden für alle getesteten Matrices mit tiefgefrorenem Proben erzielt, sowohl mit dem Mikro-Dismembrator als auch mit dem cryoPREP®. Dieser Ansatz des Probenaufschlusses kommt daher auch in dem etablierten „Meta-Omics“-Probenvorbereitungsprotokoll zur Anwendung (19).

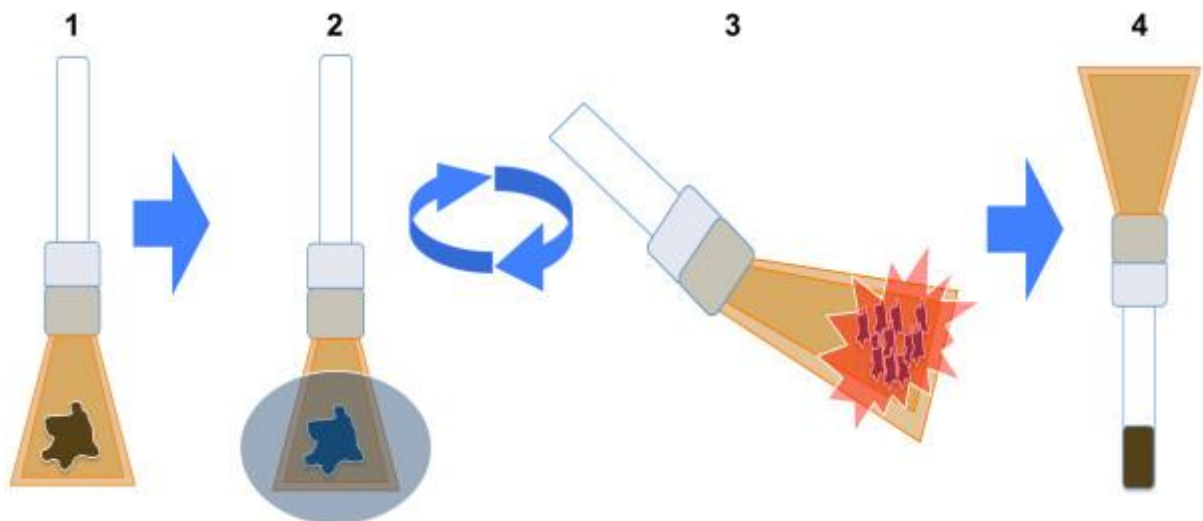


Abbildung 6. Überblick über das cryoPREP®-Verfahren (113). Im ersten Schritt wird die Probe in der Mitte eines Covaris tissueTubes platziert. Im darauffolgenden zweiten Schritt wird die Probe in flüssigem Stickstoff eingetaucht und gefroren. Im dritten Schritt erfolgt die mechanische Pulverisierung der tiefgefrorenen Probe. Das tissueTube wird in einem weiteren vierten Schritt gedreht, um die Probe in einem Covaris-Glasfläschchen zu sammeln. Abbildung: Savic

et al. 2013 (113), zu den Genehmigungsrechten siehe Kapitel IX: Anhang, 3. Erlaubnis zur Vielfältigung.

So aufbereitete Kotproben wurden mit den verschiedenen Meta-Omics-Techniken untersucht. Diese Kombination von Methoden zur Erfassung der genetischen Daten (Metagenom) wie auch der Proteinzusammensetzung (Proteom) und der metabolischen Daten (Metabolom) sichert Ergebnisse gegenseitig ab und wird zunehmend eingesetzt, um die Zusammensetzung des Mikrobioms möglichst umfassend zu charakterisieren (114). Die Entwicklung von OMICS-Techniken, einschließlich der Shotgun-Metagenomik (Untersuchung von mikrobiellen Genomen und Taxa/Stämmen), Metatranskriptomik (Genexpression), Metaproteomik und Metabolomik (Analyse von mikrobiellen Proteinen und Metaboliten) (115), erlaubt eine umfassende Charakterisierung des Mikrobioms und somit die Beurteilung der taxonomischen Zusammensetzung auf Stammebene, der potentiellen Funktionen, sowie der Stoffwechselaktivität innerhalb eines komplexen Systems und hilft bei der Verbesserung der Gesundheit und der Behandlung von Krankheiten. Abbildung 7 zeigt diese Verknüpfung der Meta-Omics-Ansätze für die Anwendung auf klinische Proben und hat mikrobielle Spezies, Stoffwechselwege und Metabolite identifiziert, die mit der Entwicklung und Behandlung (menschlicher) Krankheiten in Verbindung stehen (116). Tilocca et al. (115) beschrieben 2020 in einer Publikation über die Entwicklungen des Einsatzes von Meta-Omics-Wissenschaften zur Charakterisierung der Darmmikrobiota in Zusammenhang neurodegenerativer Krankheiten wie Multiple Sklerose, Alzheimer-Krankheit oder Parkinson-Krankheit. Der multifunktionale integrierte Einsatz von OMICS-Technologien erlaubt dabei die Klärung der Wechselwirkung zwischen dem zentralen und enterischen Nervensystem und dem MDT (Darm-Hirn-Achse). Diese Studie ist beispielhaft für den kontinuierlichen technologischen Fortschritt der OMICS-Techniken, um auf Grundlage des integrierten Ansatzes das Potential und die leistungsstarken Plattformen so auszunutzen, um funktionelle Daten und Ergebnisse zu erhalten, die mit anderen Untersuchungsmethoden nicht erreicht werden können (115).

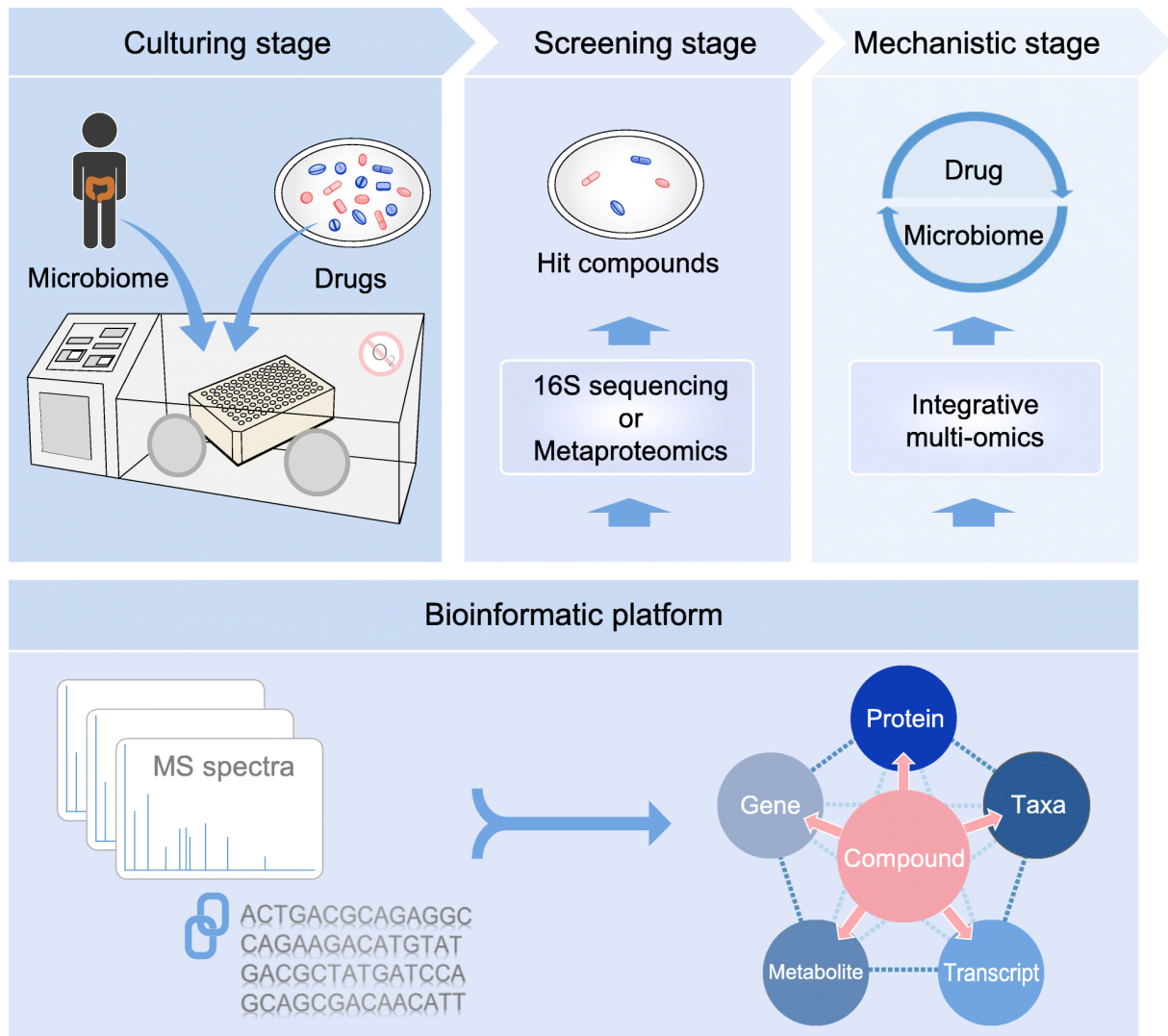


Abbildung 7. Anwendung der Meta-Omics-Techniken (116). Einsatz der verschiedenen Plattformen zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Medikamenten und dem Mikrobiom. Abbildung: Zhang et al 2019 (116) unter Creative Commons CC-BY 4.0.

In unserer Studie wurden die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung kombiniert mit Analysen für die Metabolomik und Metaproteomik. Bei der 16S rRNA Sequenzierung werden die genetischen Informationen der kleineren Untereinheiten der ribosomalen RNA der Prokaryoten sequenziert und im Anschluss taxonomisch klassifiziert (117). Die Metagenomanalyse kann zur Erfassung der gesamten genomischen DNA und damit zur Abbildung der Pathobionten einer Biozönose herangezogen werden (9). Neben der Darstellung der Biodiversität in einer Probe dient dieser holistische Ansatz auch der Identifizierung neuer Mikroorganismen oder unerwarteter Pathogene (19, 76, 112). Im Gegensatz zur 16S rRNA-Gen-Sequenzierung liefert die Metagenomik neben dem weitverbreiteten Einsatz in Mikrobiom-Studien funktionelle Informationen bis auf Stamm-Ebene für alle Arten von Mikroorganismen (116).

In unserer Studie zeigte die taxonomische Analyse der fäkalen Mikrobiome über die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung und die Metaproteomik-Analysen der verschiedenen Schweine eine sehr dynamische Mikrobiom-Zusammensetzung. Die Profile der 16S rRNA-Gene und Metaproteomik waren insgesamt sehr ähnlich und wiesen ein typisches fäkales Mikrobiom von Säugetieren auf, das hauptsächlich aus den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes besteht und in ähnlicher Form auch von Isaacson et al. (40) im Jahr 2012 gezeigt wurde. Das fäkale Mikrobiom wurde dominiert von *Prevotellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* und *Clostridiaceae*. In einer Studie von Correa-Fiz (118) von 2019 wurde ebenfalls die fäkale bakterielle Gemeinschaft von Schweinen analysiert. Hier wurden u.a. *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* und *Porphyromonadaceae* nachgewiesen (118). Holman et al. (119) haben 2017 in fäkalen Proben die Gattungen *Prevotella*, *Clostridium*, *Alloprevotella*, *Lactobacillus* und *Ruminococcus* gefunden (119).

Etwa 20 % der 16S rRNA-Gene und bis zu 35 % im Metaproteom wurde die Familie *Prevotellaceae* identifiziert, was auch in einer Publikation von Heinritz et al. (120) im Jahr 2016 gezeigt wurde. Die Zusammensetzung der Mikrobiome von Kot und Dickdarminhalt war ähnlich, was die sehr wichtige Möglichkeit eröffnet, Kot als minimal-invasive Probe für zukünftige Analysen des GIT's heranzuziehen. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die erfassten Mikrobiome aus dem Ileum stark von den oben beschriebenen. Im Bereich des Ileums dominierten *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae* und *Peptostreptococcaceae*. Isaacson et al. (40) konnten ebenfalls Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms zwischen distalem Ende des Verdauungstraktes und Ileum nachweisen (40). In einer Publikation aus dem Jahr 2018 von Crespo-Piazuelo (121) wurde die porcine bakterielle Zusammensetzung entlang des GIT beschrieben. Hier wurden im Ileum die beiden Gattungen *Streptococcus* und unspezifizierte Gattungen der Familie *Clostridiaceae* vorgefunden. Ebenso wiesen sie nach, dass die Gattung *Prevotella* die dominante Gattung im Dickdarm mit 40,90 % im proximalen und 34,99 % im distalen Teil war (121).

Bei der funktionellen Analyse mit Hilfe der Metaproteomik wurde in unserer Studie eine geringe Variabilität zwischen den einzelnen Tieren und an den Beprobungstagen festgestellt. Die Datenintegration der Metaproteomik und Metabolomik zeigte dabei eine große Abdeckung der Stoffwechselwege. Die Analyse des Metaboloms von Schweinekot erfasste zusätzlich Aminosäuren und verwandte Abbauprodukte, Kohlenstoff-Hauptmetabolite, Fettsäuren sowie

kurzkettige Fettsäuren (SCFA). Acetat zeigte sich als die am häufigsten vorkommende SCFA. Butyrat und Propionat wurden ebenfalls in hohen Konzentrationen detektiert. Die hier nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren wurden auch in einer Studie von Heinritz et al. (2016) beschrieben (120). Wesentliche funktionelle Zuordnungen und Metabolite waren mehr oder weniger stabil, vor allem zeigten Analysen hinsichtlich der Profile der kurzkettigen Fettsäuren einen relativ stabilen funktionellen Zustand.

Die gewonnenen Daten sind sowohl für Studien zum Mikrobiom des Nutztiers Schwein als auch für biomedizinische Infektionsmodelle in der Humanmedizin wertvoll. Das Schwein bietet gegenüber der Maus und anderen Labornagern entscheidende Vorteile. In Bezug auf Anatomie und Physiologie der Körperorgane ist das Schwein, im Vergleich zu Nagetieren, dem Menschen ähnlicher und stellt ein gutes Modell für die Untersuchung diverser mikrobieller Infektionskrankheiten dar. Menschen und Schweine ernähren sich beide omnivor. Insgesamt lassen sich gewonnene Ergebnisse aus Experimenten, die an Schweinen durchgeführt wurden, besser auf den Menschen übertragen, als die aus murinen Modellen (37, 87). Vergleicht man den Verdauungstrakt von Menschen und Mäusen, weist dieser sehr deutliche Unterschiede auf, vor allem im Dickdarm (86, 88). Untersuchungen des Darmmikrobioms beim Schwein ergaben hingegen eine typische Zusammensetzung aus den beiden Phyla Firmicutes und Bacteroidetes, die der des Menschen ähnelt (40, 119). Im Detail konnten auch Lamendella et al. (42) zeigen, dass das fäkale Mikrobiom des Schweins von den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes dominiert wurde, was mit verschiedenen Studien der Darmumgebung von Säugetieren übereinstimmt. Die am häufigsten vorkommenden Bakteriengruppen auf Ordnungsebene waren *Clostridiales*, unklassifizierte Firmicutes, *Bacteroidales*, *Spirochaetales*, unklassifizierte Gammaproteobakterien und *Lactobacillales* (42).

Die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms passt sich in der Regel sehr eng an die Entwicklung der Tiere an und ist an der allgemeinen Entwicklung sowie den Stoffwechselbedürfnissen der Tiere beteiligt. Während des Wachstums des Schweins kommt es zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms. Auch hier wurden im distalen Darmtrakt zwei dominierende Hauptphyla - Firmicutes und Bacteroidetes - nachgewiesen. Im Ileum jedoch gehörte der Großteil Bakterien zum Phylum Proteobacterium (bis zu 40%). Firmicutes konnten ebenso dominant im Ileum nachgewiesen werden (40).

Das hier erarbeitete und publizierte Protokoll sowie die erhobenen Basisdaten des porcinen Mikrobioms sollen insbesondere bei nachfolgenden Studien zur infektionsbedingten Auslenkung des Mikrobioms Anwendung finden.

Nutzung moderner Sequenziertechniken zur Detailcharakterisierung von Pathogenen und Kofaktoren

Im Rahmen des zweiten Studienteils wurde ein aktueller Fall der porcinen epidemischen Diarrhoe in Nordwestdeutschland analysiert. Dabei wurde PEDV als pathogener Vertreter des Kotviroms metagenomisch und auf Basis der erfassten viralen Genomdaten dann auch phylogenetisch untersucht. Des Weiteren wurden die Datensätze verwendet, um Koinfektionen bzw. das Vorhandensein weiterer Viren aufzudecken. Hier zeigte sich eine der Stärken der Metagenomanalyse, da nicht nur das Pathogen selber, sondern auch die Begleitflora über die breit erfassten genetischen Daten analysiert werden kann.

PED ist eine hochkontagiöse Darmerkrankung des Schweines, die durch das gleichnamige Porcine epidemische Diarrhoe Virus (PEDV), ein Alphacoronavirus aus der Familie der *Coronaviridae*, welches eng mit dem Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) verwandt ist, ausgelöst wird (89). Nach der Erstbeschreibung 1971 wurden diverse Ausbrüche in Europa gemeldet, die jedoch in den folgenden Jahren stark zurück gingen (93). Da die Erkrankung weder melde- noch anzeigepflichtig ist, fehlen jedoch Überwachungsdaten, die Aufschluss über eine stille Ausbreitung geben könnten.

In die Schlagzeilen geriet die Erkrankung nach verheerenden Ausbrüchen 2013 in den USA und später in Kanada (122). Das Virus verbreitete sich in kürzester Zeit über insgesamt 29 amerikanische Staaten und verursachte einen immensen finanziellen Schaden (123). Genomanalysen bestätigten, dass die hochvirulenten Virusstämme ihren Ursprung in Asien hatten (122), wo seit 2011 auch von schwersten Verläufen berichtet worden war (124). Durch diese Ereignisse aufgeschreckt, wurde die Überwachung auch in vielen anderen Ländern mit nennenswerter Schweineproduktion intensiviert. In der Folge wurden PED-Fälle in diversen europäischen Ländern gemeldet, die jedoch vorwiegend mit mildereren Verläufen assoziiert waren (91, 106, 125-130). Mit Ausnahme eines Ausbruchs in der Ukraine (131), wurden diese Geschehen durch Virusvarianten verursacht, die im Gegensatz zu den hochvirulenten US-amerikanischen

und asiatischen sogenannten „NON-INDEL“-Stämmen Insertionen und Deletionen im Spike-Gen aufwiesen, untereinander aber hohe Identitäten zeigten (132). Diese Stämme wurden als „INDEL“-Varianten bezeichnet. Die schweren Verläufe, die es immer wieder gab, konnten keinem konkreten Faktor oder einer Koinfektion zugeschrieben werden (132). Dennoch ist bei Vorliegen einer Infektion mit anderen enteralen Pathogenen wie beispielsweise Rotavirus A oder einer besonderen Parasitenbelastung von einer Verschärfung der Situation für das Einzeltier auszugehen. Nach diesen Fällen ebten die offiziellen Berichte wieder ab, obgleich aus der Praxis weiter von Fällen berichtet wurde (S. Blome, persönliche Mitteilung).

Im Frühjahr 2019, fünf Jahre nach der Wiedereinschleppung der PED nach Mitteleuropa, kam es in einem Ferkelerzeugerbetrieb im Nordwesten Deutschlands zu einem Ausbruch, der Sauen, ihre Saugferkel und Absetzer betraf. In einigen Durchgängen waren deutliche Verluste zu verzeichnen, so dass ein Interesse bestand, das ursächliche Virus näher zu charakterisieren und der Frage nachzugehen, wie sich die Stämme möglicherweise verändert hatten. Dieser Betrieb wurde daher für eine weiterführende Analyse ausgewählt.

Nach der initialen Bestätigung von PEDV wurden Kot- und Dünndarmproben von betroffenen Schweinen metagenomischen Analysen mittels Next-Generation Sequencing unterzogen. Im Detail wurden Kot- und Darmproben von fünf Sauen und zwei Ferkeln für einen RNA-Shotgun-Sequenzierungsansatz über Illumina MiSeq™ verwendet. Die resultierenden Genomsequenzen wurden für phylogenetische Analysen mit prototypischen Stämmen verwendet und die taxonomische Klassifizierung wurde mit Hilfe der Software-Pipeline RIEMS (Reliable Information Extraction of Metagenomic Sequence datasets) durchgeführt (133). Dabei wurden die aktuellen Virusstämme mit den Stämmen aus den vorherigen Studien verglichen, um die Evolution des Virus zu verfolgen und mögliche Virulenzunterschiede zu detektieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die ursächlichen Virusstämme ein eigenes, neues Cluster innerhalb der S-INDEL-Stämme bilden, mit über 99,9 % Identität untereinander. Zwei Stämme aus Ungarn und ein Stamm aus Frankreich aus dem Jahr 2019 zeigten Übereinstimmungen von über 99,5 % zu diesen deutschen Stämmen, so dass davon auszugehen ist, dass das Virus weiter in Europa zirkulierte und sich in eine ähnliche Richtung entwickelte (109). Zu den deutschen Stämmen aus dem Jahr 2014 bestand eine Identität von nur noch 98,5 %. Weit entfernte Verwandte in dem Vergleich waren die hochvirulenten NON-INDEL-Stämme aus China und den USA mit einer Identität von etwa 95 %.

In den Kotproben konnten neben dem Alphacoronavirus u.a. auch *Astroviridae*, *Picornaviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Endornaviridae*, sowie einige *Reads* der Familie der *Picobirnaviridae* taxonomisch zugeordnet werden, bei denen sich die Frage stellt, in wie weit sie den Schweregrad der Infektion beeinflussen. Pico steht für „klein“ und „bi“ für das Vorhandensein zweier (bi) RNA-Segmente. Es handelt sich also um kleine, doppelsträngige RNA-Viren mit segmentiertem Genom (134), die weltweit vorkommen (135). Sie werden oft in Kotproben von Menschen, vielen Haussäugetierarten, Wildtieren, Vögeln und Reptilien nachgewiesen und grundsätzlich mit Durchfall assoziiert (134, 136, 137). Es wird von einer erfolgreichen fäkal-oralen Übertragung von Tier zu Tier ausgegangen (137). Zu den Studien, die ebenfalls Picobirnaviren nachweisen konnten gehört die Arbeit von Lager et al. (47). In dieser Studie wurden neben *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Picornaviridae* und *Parvoviridae* auch *Picobirnaviridae* identifiziert. Die Kotproben stammten von vier verschiedenen Schweinen, zwei klinisch gesunden Kontrollschweinen, und zwei Tieren, die an chronischem Durchfall litten. Eines wies zudem eine PRRSV (Porzines Reproductives und Respiratorisches Syndrom Virus) Infektion auf. *Picobirnaviridae* wurden hier vorwiegend mit an Diarrhoe leidenden Schweinen assoziiert. Allerdings sind *Picobirnaviridae* auch bei Ferkeln ohne Durchfall gefunden worden (138) und könnten daher auch eine Rolle als Kofaktor spielen, wenn es beispielsweise zu einer Verschiebung des fäkalen Viroms kommt. Derartige Verschiebungen können unter Umständen mit Krankheitszuständen assoziiert werden, insbesondere Schleimhautentzündungen (43). Ein abnormales enterisches Virom, sowie ein Diversitätsverlust der Darmbakterienpopulationen zeigte sich beispielsweise in Studien bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcera (139). Für unsere Studie bleibt also zu klären, in wie weit die klassifizierten picobirnaviralen Sequenzen den Schweregrad der Infektion beeinflussen haben. In diese Richtung könnten zukünftig weitere Studien angeschlossen werden. Hinsichtlich des Kotviroms von Schweinen, die an PED erkrankt sind, sowie die Auswirkung auf die Schwere der Krankheit, bleiben noch viele Fragen offen. Gezeigt wurde jedoch, dass das fäkale Virom divers ist. Das Virom PEDV-positiver Schweine aus den USA umfasste in einer Studie vorwiegend RNA-Viren, die den Familien *Astroviridae* (*Mamastrovirus*), *Picornaviridae* (*Enterovirus*, *Posavirus*, *Sapelovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus* und *Pasivirus*), *Caliciviridae* (*Sapovirus*) und *Coronaviridae* zugeordnet werden konnten. Zu den enthaltenen Coronaviren gehörten Vertreter des Genus *Deltacoronavirus* sowie PEDV (*Alphacoronavirus*) (96). Einen Teil dieser Virusfamilien (*Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Leviviridae*, *Nidovirales*, *Picornaviridae* und

unklassifizierte Picornavirales) konnten auch Hanke et al. (2017) nachweisen, wobei, wie oben ausgeführt, keine Korrelation zur Schwere der Klinik hergestellt werden konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in dieser Arbeit in beiden Studienteilen der Einsatz moderner Sequenziertechniken - für die Analyse des porcinen Darmmikrobioms und die detaillierte Pathogencharakterisierung - im Fokus stand. Sowohl die Protokolloptimierung für „Meta-Omics“ Analysen (Kombination aus 16S rRNA-Gen-Sequenzierung, Metaproteomik und Metabolomik) zur Basischarakterisierung des porcinen Darmmikrobioms, als auch die Detailcharakterisierung des wichtigen enteralen Pathogens PEDV und von in Kotproben enthaltenen Kofaktoren zeigen die große Bandbreite der Einsatzgebiete der OMICS-Techniken und insbesondere der NGS-basierten Metagenomik. Es ist davon auszugehen, dass diese Technik sich noch weiterentwickelt und zukünftig eine noch wichtigere Rolle in der Veterinärmedizin einnehmen wird.

Kapitel VI: ZUSAMMENFASSUNG

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der technologische Fortschritt im Bereich Hochdurchsatzsequenzierung und die begleitende rasante Entwicklung im Bereich Datenanalyse und Bioinformatik gestatten uns heute Metagenomanalysen in bislang nie erreichter Qualität und Detailschärfe. Dabei lassen sich sowohl die mikrobiellen Gemeinschaften eines bestimmten Lebensraums darstellen als auch neue Mikroorganismen oder Pathogene identifizieren und charakterisieren. Darüber hinaus ermöglicht die Metagenomanalyse in Kombination mit weiteren „Omics“-Technologien auch die funktionellen Aspekte der Lebensgemeinschaften zu erfassen und so zum Gesamtverständnis von ökologischen und patho-biologischen Zusammenhängen beizutragen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Studien in der Nutz- und Modelltierart Schwein widmeten sich zwei Aspekten der oben genannten Ansätze, d.h. der Optimierung und Anwendung sogenannter „Meta-Omics“ Abläufe zur Charakterisierung des porcinen Darmmikrobioms und der Detailcharakterisierung eines aktuellen Falles der porcinen epidemischen Diarrhoe und begleitender Koinfektionen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit interdisziplinären Partnern eine integrierte Probenvorbereitung für tiefgefrorene Kotproben entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bearbeitung schockgefrorener Proben mittels mechanischer Desintegration („CryoPrep“) alle nachfolgenden Meta-Omics-Ansätze und -Analysen in hoher Qualität gestattet. Darüber hinaus konnte das natürliche Darmmikrobiom heranwachsender Schweine charakterisiert werden. Die untersuchten Kot- und Dickdarmproben waren dabei so ähnlich, dass die nicht-invasive Kotuntersuchung auch für weitere Studien zur infektionsbedingten Auslenkung des Darmmikrobioms zur Anwendung kommen kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Metagenomanalyse dazu verwendet, das Wiederauftreten der porcinen epidemischen Diarrhoe in Deutschland zu untersuchen. Hierbei lag der Fokus vor allem auf der genetischen Charakterisierung des kausativen viralen Erregers sowie dessen mögliche phylogenetische Einordnung. Es konnte gezeigt werden, dass die ursächlichen Virusstämme ein eigenes, neues Cluster innerhalb der sogenannten S-INDEL-Stämme bilden. Zwei Stämme aus Ungarn und ein Stamm aus Frankreich aus dem Jahr 2019 zeigten Übereinstimmungen von über 99,5 % zu diesen deutschen Stämmen, so dass davon auszugehen ist, dass

das Virus weiter in Europa zirkulierte und sich in eine ähnliche Richtung entwickelte. Des Weiteren wurde ein Picobirnavirus im Kot der erkrankten Schweine gefunden, dessen Potential als Pathogen noch weiterer Klärung bedarf.

Kapitel VII: SUMMARY

VII. SUMMARY

Technological progress in the field of high-throughput sequencing and the accompanying rapid development in the field of data analysis and bioinformatics now allow us to perform metagenomic analyses with a quality and level of detail never before achieved. This allows us to represent the microbial communities of a particular habitat as well as to identify and characterize new microorganisms or pathogens. In addition, metagenome analysis in combination with other "omics" technologies also allow the functional aspects of the communities to be captured and thus contribute to the overall understanding of ecological and patho-biological relationships. The studies presented here for the livestock and model species pig were dedicated to two aspects of the above approaches, i.e., the optimization and application of so-called "meta-omics" workflows to characterize the porcine gut microbiome, and the detailed characterization of a recent case of porcine epidemic diarrhea and concomitant co-infections.

In the first part of the present work, an integrated sample preparation for frozen fecal samples was developed with interdisciplinary partners. It could be shown that processing shock-frozen samples by mechanical disintegration ("CryoPrep") allows all subsequent meta-omics approaches and analyses in high quality. Furthermore, the natural gut microbiome of growing pigs could be characterized. The examined fecal and large intestine samples were so similar that the non-invasive fecal analysis can also be applied for further studies on infection-related deflection of the gut microbiome.

In the second part of the work, metagenomic analysis was used to investigate the re-emergence of porcine epidemic diarrhea in Germany. Here, the focus was mainly on the genetic characterization of the causative viral pathogen as well as its possible phylogenetic classification. It could be shown that the causative viral strains form a separate, new cluster within the so-called S-INDEL strains. Two strains from Hungary and one strain from France in 2019 showed matches of more than 99.5% to these German strains, so it can be assumed that the virus continued to circulate in Europe and evolved in a similar direction. Furthermore, a picobirnavirus was found in the feces of the diseased pigs, and its potential as a pathogen requires further clarification.

Kapitel VIII: LITERATURVERZEICHNIS

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Van Borm S, Belák S, Freimanis G, Fusaro A, Granberg F, Höper D, King DP, Monne I, Orton R, Rosseel T. 2015. Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? *Methods Mol Biol* 1247:415-36.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
3. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
4. Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, Khan SH, Menchen SM, Heiner CR, Chen SM. 1997. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25:4500-4.
5. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-80.
6. Bentley DR, Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Cheetham, R. K., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53-59.
7. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA,

- Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475:348-52.
8. Shendure J, Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1135-1145.
9. Scheuch M. 2015. Metagenomanalyse von Sequenzdaten aus diagnostischen Proben zur Erregeridentifikation Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
10. Hanke D. 2017. Molekular-epidemiologische Untersuchung veterinärmedizinisch relevanter RNA-Viren mittels Next-Generation Sequencing Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
11. Eid J, Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D. 2009. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* 323:133-138.
12. Venkatesan BM, Bashir, R. 2011. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nature Nanotechnology* 6:615-624.
13. Loman NJ, Pallen, M. J. 2015. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology* 13:787-794.
14. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 122:e59.
15. Srivastav R. SG, Tripathi V., Kumar P., Tripathi P., Kishore A., Kamle M. 2019. Recent Advances in Microbial Genome Sequencing in Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems, vol 2. Springer Singapore.
16. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30:418-26.
17. Illumina. 2010. Illumina Sequencing Technology. Technology Spotlight: Illumina® Sequencing doi:Pub. No. 770-2007-002:5.
18. Mihalov-Kovacs E, Feher, E., Martella, V., Banyai, K., Farkas, S. L. 2014. The fecal virome of domesticated animals. *Virus Disease* 25:150-157.
19. Wylezich C, Papa, A., Beer, M., Höper, D. 2018. A Versatile Sample Processing Workflow for Metagenomic Pathogen Detection. *Scientific Reports* 8:12.
20. Gilbert JA, Dupont, C. L. 2011. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Reviews of Marine Science* 3:347-371.
21. Chen K, Pachter L. 2005. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput Biol* 1:106-12.

22. Höper D, Wylezich C, Beer M. 2017. Loeffler 4.0: Diagnostic Metagenomics. *Adv Virus Res* 99:17-37.
23. Kwok KTT, Nieuwenhuijse DF, Phan MVT, Koopmans MPG. 2020. Virus Metagenomics in Farm Animals: A Systematic Review. *Viruses* 12.
24. Gu W, Miller S, Chiu CY. 2019. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol* 14:319-338.
25. Carroll D, Daszak, P., Wolfe, N. D., Gao, G. F., Morel, C. M., Morzaria, S., Pablos-Méndez, A., Tomori, O., Mazet, J. A. K. 2018. The Global Virome Project. *Infectious Diseases* 359:872-874.
26. Yinda CK, Vanhulle E, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Shi C, Ghogomu SM, Maes P, Van Ranst M, Matthijssens J. 2019. Gut Virome Analysis of Cameroonians Reveals High Diversity of Enteric Viruses, Including Potential Interspecies Transmitted Viruses. *mSphere* 4:e00585-18.
27. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. 2011. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog* 7:e1002218.
28. Blomström A-L, Ye X, Fossum C, Wallgren P, Berg M. 2018. Characterisation of the Virome of Tonsils from Conventional Pigs and from Specific Pathogen-Free Pigs. *Viruses* 10:382.
29. Blomström AL, Fossum C, Wallgren P, Berg M. 2016. Viral Metagenomic Analysis Displays the Co-Infection Situation in Healthy and PMWS Affected Pigs. *PLoS One* 11:e0166863.
30. Kwok KTT, Nieuwenhuijse, D. F., Phan, M. V. T., Koopmans, M. P. G. 2020. Virus Metagenomics in Farm Animals: A Systematic Review. *Viruses* 12:22.
31. Hoffmann B, Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K. V., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., Mettenleiter, T. C., Beer, M. 2012. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18:469-472.
32. Scheuch M, Höper, D., Beer, M. 2015. RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. *BMC Bioinformatics* 16:17.
33. Hoffmann B, Tappe, D., Höper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niederstraßer, O., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., Lutter, C., Abendroth, B., Teifke, J. P., Cadar,

- D., Schmidt-Chanasit, J., Ulrich, R. G., Beer, M. 2015. A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *The New England Journal of Medicine* 373:154-162.
34. Blomström AL, Widen, F., Hammer, A. S., Belak, S., Berg, M. 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology* 48:4392-4396.
35. Bennett AJ, Paskey, A. C., Ebinger, A., Pfaff, F., Priemer, G., Höper, D., Breithaupt, A., Heuser, E., Ulrich, R. G., Kuhn, J. H., Bishop-Lilly, K. A., Beer, M., Goldberg, T. L. 2020. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* 586:424-428.
36. Brade W, Distl, O. 2016. Die intestinale Mikrobiota bei Schweinen: Strukturen und Funktionen. *Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft* 94:17.
37. KoInfekt. 2020. Aufklärung der Pathomechanismen bakto-viraler Koinfektionen mit neuen biomedizinischen Modellen. *Projekt-factsheet*:1-87.
38. Karlsson OE, Larsson, J., Hayer, J., Berg, M., Jacobson, M. 2016. The Intestinal Eukaryotic Virome in Healthy and Diarrhoeic Neonatal Piglets. *PLOS ONE* 11:16.
39. Lederberg J, Mc Cray, A. T. 2001. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 15:2.
40. Isaacson R, Kim, H. B. 2012. The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews* 13:100-109.
41. Pajarillo EAB, Chae, J-P., Balolong, M. P., Bum Kim, H., Kang, D-K. 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *Applied Microbiology, Molecular and Cellular Biosciences Research Foundation* 60:140-146.
42. Lamendella R, Domingo, J. W., Ghosh, S., Martinson, J., Oerther, D. B. 2011. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology* 11:17.
43. Monaco CL, Kwon, D. S. 2017. Next-generation Sequencing of the DNA Virome from Fecal Samples. *Bio Protoc* 7:14.
44. Sachsenröder J. 2016. Metagenomic analysis of viruses present in faeces of domestic pigs and wild urban rats. Freie Universität Berlin.
45. Sachsenröder J, Twardziok, S. O., Scheuch, M., Johne, R. 2014. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. *PLOS ONE* 9:11.

46. Sachsenröder J, Twardziok, S., Hammerl, J. A., Janczyk, P., Wrede, P., Hertwig, S., Johne, R. 2012. Simultaneous identification of DNA and RNA viruses present in pig faeces using process-controlled deep sequencing. *PLOS ONE* 7:11.
47. Lager KM, Ng, T. F., Bayles, D. O., Alt, D. P., Delwart, E. L., Cheung, A. K. 2012. Diversity of viruses detected by deep sequencing in pigs from a common background. *Veterinary Diagnostic Investigation* 24:1177-1179.
48. Ogilvie LA, Jones, B. V. 2015. The human gut virome: a multifaceted majority. *Frontiers in Microbiology* 6:12.
49. Kernbauer E, Ding, Y., Cadwell, K. 2014. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature* 516:94-98.
50. Amimo JO, El Zowalaty, M. E., Githae, D., Wamalwa, M., Djikeng, A., Nasrallah, G. K. 2016. Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa. *Arch Virology* 161:887-897.
51. Werzin L-M, Resch, B. 2015. Das Mikrobiom des Neugeborenen. *Pädiatrie & Pädologie* 50:160-167.
52. Durso LM, Harhay, G. P., Smith, T. P., Bono, J. L., Desantis, T. Z., Harhay, D. M., Andersen, G. L., Keen, J. E., Laegreid, W. W., Clawson, M. L. 2010. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4858-4862.
53. Klär I. 2008. Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln. Freie Universität Berlin.
54. Adlerberth I, Wold, A. E. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica* 98:229-238.
55. Urubschurov V. 2010. Intestinale Hefen, deren Stoffwechselaktivität und Interaktion mit ausgewählten Bakteriengruppen bei Absetzferkeln. Universität Rostock.
56. Verbraucherschutz BdJuf. 2017. Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung - TierSchNutzTV), vol BGBl. I; Art. 3 Abs. 2 G v. 30.6.2017 I 2147, p 32.
57. Helke KL, Ezell, P. C., Duran-Struuck, R., Swindle, M. M. 2015. Biology and Diseases of Swine. *Laboratory Animal Medicine* 3:695-769.

58. Farmer C, Devillers, N., Rooke, J. A., Le Dividich, J. 2006. Colostrum production in swine: from the mammary glands to the piglets. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 1:17.
59. Li N, Huang, S., Jiang, L., Wang, W., Li, T., Zuo, B., Li, Z., Wang, J. 2018. Differences in the Gut Microbiota Establishment and Metabolome Characteristics Between Low- and Normal-Birth-Weight Piglets During Early-Life. *Frontiers in Microbiology* 9:16.
60. Inoue R, Tsukahara, T., Nakanishi, N., Ushida, K. 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51:257-265.
61. Waldmann K-H, Wendt, M. 2001. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, vol 3. PAREY.
62. Gresse R, Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S. 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology* 25:851-873.
63. Kleine Klausing H. 2012. Durchfallprophylaxe mittels durchdachter Ferkelfütterung: Der aktuelle Wissensstand. *aktuell Tiergesundheit* 02:20.
64. Kleine Klausing H, Gerstenkorn, H. 2016. Dysbiose beim Schwein: So kann die Fütterung helfen. *aktuell Tiergesundheit* 04:20.
65. Manners MJ. 1976. The development of digestive function in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society* 35:49-55.
66. Han GG, Lee, J. Y., Jin, G. D., Park, J., Choi, Y. H., Kang, S. K., Chae, B. J., Kim, E. B., Choi, Y. J. 2018. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific Reports* 8:1-9.
67. Pluske JR, Turpin, D. L., Kim, J. C. 2018. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition* 4:187-196.
68. Engelhardt Wv, Breves, G. 2009. *Physiologie der Haustiere*, vol 3. Enke.
69. Işık K. 2004. Untersuchungen zur präbiotischen Wirkung von Lactulose auf die Mikroflora des Magen–Darm–Traktes von Sauen im peripartalen Zeitraum. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
70. Wang X, Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., Apple, J., Maxwell, C. V., Lee, J. A., Li, Y., Zhao, J. 2019. Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* 7:1-18.

71. Aguilera M, Cerda-Cuellar, M., Martinez, V. 2015. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* 6:10-23.
72. Fleury MA, Le Goff, O., Denis, S., Chaucheyras-Durand, F., Jouy, E., Kempf, I., Alric, M., Blanquet-Diot, S. 2017. Development and validation of a new dynamic in vitro model of the piglet colon (PigutIVM): application to the study of probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2533-2547.
73. Münster P. KJ. 2018. Grundsteine für ein gesundes Ferkelleben (Teil 1) - Auf eine rosige Zukunft gefüttert. *DGS Magazin* 48:28-30.
74. Vögeli P, Bertschinger, H-U. 1999. Oedemkrankheit und Colidurchfall beim Schwein - Pathogenese und züchterische Bekämpfung - Bedeutung molekulargenetischer Tests. *Forschung für Leben* 53:7.
75. grosse Beilage E, Wendt, M. 2013. Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand, vol 1. Ulmer-UTB.
76. Selbitz H-S, Truyen, U., Valentin-Weigand, P. 2015. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, vol 10. Enke.
77. Union EPudRdE. 2003. Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und Rates über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung, vol L 268/29, p 15.
78. Kamphues J, Coenen, M., Kienzle, E. 2009. Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung, vol 11. M. & H. Schaper.
79. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz BfJ. 2020. Futtermittelverordnung, vol BGBl. I S. 1700, p 39.
80. Rat EPud. 2012. Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und Rates mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene, vol 2005-R0183-DE-16.09.2012-002.001-1, p 33.
81. Wan Y, Wang, F., Yuan, J., Li, J., Jiang, D., Zhang, J., Li, H., Wang, R., Tang, J., Huang, T., Zheng, J., Sinclair, A. J., Mann, J., Li, D. 2019. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut microbiota* 68:1417-1429.
82. N. Canibe OH, S. Højsgaard, and B. B. Jensen. 2011. Feed-physical-form-and-formic-acid-addition-to-the-feed-affect-the-gastrointestinal-ecology-and-growth-performance-of-growing-pigs. *American Society of Animal Science* 83:1287-1302.

83. Hooper LV, Gordon, J.I. 2001. Commensal Host-Bacterial Relationships. *Ecology and Evolution of Infection* 292:1115-1119.
84. Aguirre de Carcer D. 2018. The human gut pan-microbiome presents a compositional core formed by discrete phylogenetic units. *Scientific Reports* 8:8.
85. Shetty SA, Hugenholtz, F., Lahti, L., Smidt, H., de Vos, W. M. 2017. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiology Reviews* 41:182-199.
86. Nguyen TL, Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms* 8:1-16.
87. Meurens F, Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., Gerdts, V. 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology* 20:50-57.
88. Justice MJ, Dhillon, P. 2016. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms* 9:101-103.
89. Pospischil A, Stuedli, A., Kiupel, M. 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *Journal of Swine Health and Production* 10:81–85 (5).
90. Carvajal A, Argüello, H., Martinez-Lobo, F. J., Costillas, S., Miranda, R., G. de Nova PJ, Rubio, P. 2015. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 1:8.
91. Stadler J, Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenböck, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., Ladinig, A. 2015. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Veterinary Research* 11:8.
92. Decaro N. 2011. Alphacoronavirus. *The Springer Index of Viruses* doi:10.1007/978-0-387-95919-1:14.
93. G.C. Pritchard DJP, G. Wibberley, G. Ibata. 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Veterinary Record* 144:616-618.
94. Norman J, Lambert, G., Moon, H. W., Stark, S. L. 1973. Age Dependent Resistance to Transmissible of Swine (TGE). *Can J comp Med* 3:4.
95. OIE. 2014. Infection With Porcine Epidemic Diarrhoea Virus. OIE technical factsheet:4.
96. Chen Q, Wang, L., Zheng, Y., Zhang, J., Guo, B., Yoon, K. J., Gauger, P. C., Harmon, K. M., Main, R. G., Li, G. 2018. Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virology Journal* 15:95.

97. Akimkin V, Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Höper, D., Jenckel, M., Pohlmann, A. 2016. New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 22:1314-1315.
98. EFSA. 2014. Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. *EFSA Journal* 12(10):68.
99. Scheffler AS. 2018. Untersuchung zum Vorkommen des Porzinen Epizootischen Diarrhoe Virus beim Wildschwein und zu den Übertragungswegen zwischen Haus- und Wildschweinen. Ludwig-Maximilians-Universität München.
100. Hanke D, Pohlmann, A., Sauter-Louis, C., Höper, D., Stadler, J., Ritzmann, M., Steinrigl, A., Schwarz, B.-A., Akimkin, V., Fux, R., Blome, S., Beer, M. 2017. Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Detail Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses* 9.
101. Changhee L. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal* 12:16.
102. Chen Q, Li, G. Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D., Yoon, K. J., Stevenson, G. W., Burrough, E. R., Harmon, K. M., Main, R. G., Zhang, J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 52:234-243.
103. Blome S, Petrov, A. 2016. Genomnachweis des Porzinen Epidemischen Diarrhoe Virus (PEDV) mittels Real-time RT-PCR. AVID-Methode VIR03 Version: 2016-08:9.
104. Stevenson GW, Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B. J., Koster, L. G., Killian, M. L., Yoon, K. J. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25:649-654.
105. Leidenberger S. 2018. Porzine epidemische Diarrhoe in Zentraleuropa – Aktuelle Situation und Stammcharakterisierung Ludwig-Maximilians-Universität München.
106. Grasland B, Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F., Blanchard, Y. 2015. Complete Genome Sequence of a Porcine Epidemic Diarrhea S Gene Indel Strain Isolated in France in December 2014. *Genome Announcements* 3:2.

107. Mesquita JR, Hakze-van der Honing, R., Almeida, A., Lourenco, M., van der Poel, W. H., Nascimento, M. S. 2015. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases* 62:586-588.
108. Pizzurro F, Cito, F., Zaccaria, G., Spedicato, M., Cerella, A., Orsini, M., Forzan, M., D'Alterio, N., Lorusso, A., Marcacci, M. 2018. Outbreak of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Abruzzi region, central-Italy. *Veterinary Medicine and Science* 4:73-79.
109. Valko A, Albert, E., Csagola, A., Varga, T., Kiss, K., Farkas, R., Ronai, Z., Biksi, I., Dan, A. 2019. Isolation and characterisation of porcine epidemic diarrhoea virus in Hungary - Short communication. *Acta Veterinaria Hungarica* 67:307-313.
110. Theuns S, Conceicao-Neto, N., Christiaens, I., Zeller, M., Desmarests, L. M., Roukaerts, I. D., Acar, D. D., Heylen, E., Matthijnsens, J., Nauwynck, H. J. 2015. Complete Genome Sequence of a Porcine Epidemic Diarrhea Virus from a Novel Outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announcements* 3:2.
111. Pensaert MB, De Bouck, P. 1978. A New Coronavirus-Like Partiele Assoeiated With Diarrhea in Swine. *Archives of Virology* 58:243-247.
112. Conceicao-Neto N, Zeller, M., Lefrere, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., Yinda, C. K., Lavigne, R., Maes, P., Van Ranst, M., Heylen, E., Matthijnsens, J. 2015. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Scientific Reports* 5:14.
113. Savic D, Gertz, J., Jain, P., Cooper, G. M., Myers, R. M. 2013. Mapping genome-wide transcription factor binding sites in frozen tissues. *Epigenetics & Chromatin* 6:10.
114. Steinhagen PR, Baumgart, D. C. 2017. Grundlagen des Mikrobioms. *Der Internist* 58:429-434.
115. Tilocca B, Pieroni, L., Soggiu, A., Britti, D., Bonizzi, L., Roncada, P., Greco, V. 2020. Gut-Brain Axis and Neurodegeneration: State-of-the-Art of Meta-Omics Sciences for Microbiota Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 21:20.
116. Zhang X, Li, L., Butcher, J., Stintzi, A., Figeys, D. 2019. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome* 7:12.
117. Danijela M. 2016. Methodenvergleich von 16S rRNA Sequenzierung und konventionellen Kulturmethode bei infektiöser Endokarditis. Medizinische Universität Graz.

118. Correa-Fiz F, Blanco-Fuertes, M., Navas, M. J., Lacasta, A., Bishop, R. P., Githaka, N., Onzere, C., Le Potier, M. F., Almagro-Delgado, V., Martinez, J., Aragon, V., Rodriguez, F. 2019. Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of domesticated and wild suids. *Scientific Reports* 9:15.
119. Holman DB, Brunelle, B. W., Trachsel, J., Allen, H. K. 2017. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* 2:14.
120. Heinritz SN, Weiss, E., Eklund, M., Aumiller, T., Louis, S., Rings, A., Messner, S., Camarinha-Silva, A., Seifert, J., Bischoff, S. C., Mosenthin, R. 2016. Intestinal Microbiota and Microbial Metabolites Are Changed in a Pig Model Fed a High-Fat/Low-Fiber or a Low-Fat/High-Fiber Diet. *PLOS ONE* 11:21.
121. Crespo-Piazuelo D, Estelle, J., Revilla, M., Criado-Mesas, L., Ramayo-Caldas, Y., Ovilo, C., Fernandez, A. I., Ballester, M., Folch, J. M. 2018. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Scientific Reports* 8:12.
122. Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol* 52:234-43.
123. Schulz LL, Tonsor GT. 2015. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *J Anim Sci* 93:5111-8.
124. Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q. 2012. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:1350-3.
125. Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, Kusar D, Papic B, Koren S, Toplak N. 2016. Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 4.
126. EFSA. 2016. Scientific Report on the collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhea.
127. Theuns S, Conceicao-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmarets LM, Roukaerts ID, Acar DD, Heylen E, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. 2015. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in belgium, january 2015. *Genome Announc* 3.

128. Mesquita JR, Hakze-van der Honing R, Almeida A, Lourenco M, van der Poel WH, Nascimento MS. 2015. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis* 62:586-8.
129. Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, Blome S, Pohlmann A, Schirrmeier H, Beer M, Hoper D. 2015. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 21:493-6.
130. Steinrigl A, Fernandez SR, Stoiber F, Pikalo J, Sattler T, Schmoll F. 2015. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Vet Res* 11:310.
131. Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S. 2015. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* 21:2235-7.
132. Hanke D, Pohlmann A, Sauter-Louis C, Hoper D, Stadler J, Ritzmann M, Steinrigl A, Schwarz BA, Akimkin V, Fux R, Blome S, Beer M. 2017. Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Detail Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses* 9.
133. Scheuch M, Höper D, Beer M. 2015. RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. *BMC Bioinformatics* 16:69.
134. Malik YS, Ghosh, S. 2020. Picobirnavirus. *Emerging Infectious Diseases* 26:89.
135. Ganesh B, Banyai, K., Kanungo, S., Sur, D., Malik, Y. S., Kobayashi, N. 2012. Detection and molecular characterization of porcine picobirnavirus in feces of domestic pigs from kolkata, India. *Indian J Virology* 23:387-391.
136. Ganesh B, Masachessi, G., Mladenova, Z. 2014. Animal picobirnavirus. *Virusdisease* 25:223-238.
137. Delmas B. 2012. Picobirnaviridae. *Virus Taxonomy* 9:535-539.
138. Wilburn L, Yodmeeklin, A., Kochjan, P., Saikruang, W., Kumthip, K., Khamrin, P., Maneekarn, N. 2017. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. *Arch Virology* 162:1061-1066.
139. Norman JM, Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D. 2015. Disease-

specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160:447-460.

Kapitel IX: ANHANG

IX. ANHANG

1. Abkürzungsverzeichnis

cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate, Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxynucleotide triphosphate, Desoxynukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESF	Europäischer Sozialfond
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GIT	Gastrointestinaltrakt
MDT	Magen-Darm-Trakt
mNGS	metagenomisches Next-Generation-Sequencing
NGS	Next-Generation-Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation
NON-INDEL	virus strain without insertion and deletion mutations, Virusstamm ohne Insertions- und Deletionsmutationen
PCR	polymerase-chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PED	porcine epidemic diarrhea, Porzine epidemische Diarrhoe

PEDV	porcine epidemic diarrhea virus, Porzine epidemische Diarrhoe Virus
pH-Wert	potential of hydrogen, Wasserstoffionenkonzentration
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus
RIEMS	<i>Reliable Information Extraction of Metagenomic Sequence datasets</i>
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcription polymerase-chain reaction, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Real Time quantitative polymerase-chain reaction, Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RuhV	Ruhugu-Virus
RusV	Rustrela-Virus
RuV	Rubella-Virus
S	Svedberg
SCFA	Short Chain Fatty Acid, kurzkettige Fettsäuren
S-INDEL	virus strain with insertion and deletion mutations, Virusstamm mit Insertions- und Deletionsmutationen
SIV	Simian Immunodeficiency Virus, Simianes Immundefizienz-Virus
<i>Spp.</i>	Spezies (Plural), Arten
STEC	Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i>

Stx 2 e	Shiga-Toxine (Stx) Typ 2 Variante e (= edema) bildende <i>E. coli</i>
TGEV	transmissible gastroenteritis virus, Transmissible Gastroenteritis Virus
US	United States, Vereinigte Staaten
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
VSBV-1	Variegated Squirrel 1 Bornavirus, Bunthörnchen-Bornavirus 1

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Übersicht über die Hauptschritte der Sequenziertechniken.....	9
Abbildung 2 - Illumina-Sequenzierung mit Brückensynthese	11
Abbildung 3 - Das intestinale Mikrobiom bei Hausschwein.....	15
Abbildung 4 - Die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beim Hausschwein.....	16
Abbildung 5 - Pathophysiologie der infektiös bedingten PED.....	22
Abbildung 6 - Überblick über das cryoPREP®-Verfahren.....	74
Abbildung 7 - Anwendung der Meta-omics-Techniken.....	76

3. Erlaubnis zur Vervielfältigung

Abbildung 1, 2 und 6 - Eine Genehmigung für die Reproduktion der Abbildungen wurde von „Springer Nature“ und dem Copyright Clearance Center eingeholt.

Abbildung 7 - Die Abbildung ist in einem Artikel veröffentlicht, der unter den Bedingungen der Creative Commons CC-By-Lizenz veröffentlicht, die die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium erlaubt, vorausgesetzt, das Originalwerk wird ordnungsgemäß zitiert. Creative Commons CC-BY 4.0

Kapitel X: DANKSAGUNG

X. DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Sutter und den beteiligten Gutachtern für die Beurteilung dieser wissenschaftlichen Arbeit danken.

Meinen Mentor Herrn Prof Dr. Martin Beer danke ich ganz herzlich, dass ich die vorliegende Arbeit an seinem Institut anfertigen konnte. Vielen Dank für das geduldige Lesen und die konstruktiven Kommentare zu den Manuskripten und dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt PD Dr. Sandra Blome für die kompetente, fachliche und zuverlässige Unterstützung, die konstruktive Kritik, das geduldige Lesen und Korrigieren, sowie der Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. Dirk Höper. Er hat mir während der gesamten Promotionszeit engagiert zur Seite gestanden und mich stets geduldig wissenschaftlich angeleitet. Vielen Dank für den Einsatz rund um das Projekt, die vielen hilfreichen Vorschläge und guten Tipps, das Korrigieren der Manuskripte sowie dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Ko-Autor*innen, die an dieser Arbeit beteiligt waren, für Ihre gute Kooperation und Mithilfe bei den Publikationen.

Darüber hinaus möchte ich allen Kolleg*innen aus dem NGS-Labor für die wunderbare Zeit, eure zuverlässige, kompetente und beratende Unterstützung bei der Laborarbeit und der herzlichen Arbeitsatmosphäre im Labor danken. Ein weiterer herzlicher Dank geht an alle Tierpfleger*innen des FLI's für die hervorragende Mithilfe während der gesamten Tierversuche an Schweinen, das geduldige Beantworten meiner organisatorischen Fragen rund um die Tierversuche und die humorvollen Stunden im Stall.

Besten Dank auch an die Exzellenzinitiative des Landes Mecklenburg-Vorpommern, gefördert von der Europäischen Union (ESF), für die Projektfinanzierung der vorliegenden Promotionschrift.

Mein besonders herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, für Ihre großartige Unterstützung in allen Lebenslagen, ihr unerschütterliches Vertrauen in mich, ihre liebevolle Motivation, aufmunternden Worte und ihren dauerhaften Rückhalt.